



TESIS DOCTORAL

Rana temporaria en los Pirineos:

Biogeografía de poblaciones

Laura Caamaño Chinchilla

2021

UniversidadeVigo

Escuela Internacional de Doctorado

Laura Caamaño Chinchilla

TESIS DOCTORAL

Rana temporaria en los Pirineos:

Biogeografía de poblaciones

Dirigida por:

Dr. Antonio Palanca Soler

2021

Universidade de Vigo

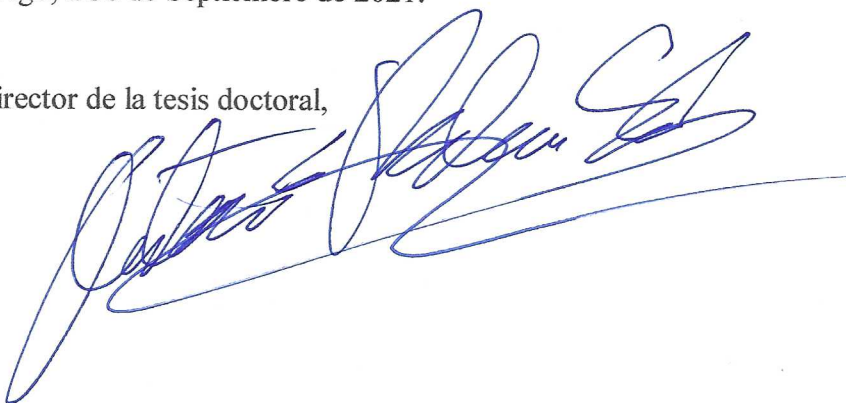
Escuela Internacional de Doctorado

El Dr. Antonio Palanca Soler,

HACE CONSTAR que el presente trabajo, titulado “*Rana temporaria* en los Pirineos: Biogeografía de poblaciones”, que presenta Laura Caamaño Chinchilla para la obtención del título de Doctora, fue elaborado bajo su dirección en el programa de doctorado “Metodología y Aplicaciones en Ciencias de la Vida” de la Universidad de Vigo.

En Vigo, a 30 de Septiembre de 2021.

El director de la tesis doctoral,



Dr. Antonio Palanca Soler

Me dijeron:

- O te subes al carro

o tendrás que empujarlo.

Ni me subí ni lo empujé.

Me senté en la cuneta

y alrededor de mí,

a su debido tiempo,

brotaron las amapolas.

Gloria Fuertes.

Mujer de verso en pecho.

.

*Esta Tesis Doctoral está
dedicada a mis queridos hermanos,
Dani, Jorge y Pili, a mis sobrinos
Ángela, Alexander y Bézany, a mi
padre y a mi madre.*

Agradecimientos

Gracias a todas las personas que me habéis acompañado y apoyado durante este proceso. En primer lugar a Antonio, quien me ofreció la oportunidad de ir a los Pirineos y realizar la Tesis, gracias por inspirarme, tu paciencia, apoyo, confianza y humor, sobre todo por enseñarme a confiar en mi misma y compartir conmigo tu sabiduría, me llevo mucho más que una Tesis.

Gracias a mis compañeros del C. A. C. T. I., Eugenio, Suso, Daniel e Inés, por formarme y los ricos cafés, a Basti y Andrés, por sus ganas de compartir conocimientos y buen humor, a Nuria, Marisa y Esther, por orientarme y motivarme durante la carrera, a Pedro Pablo por apoyarme y darme la oportunidad de formarme y competir. Gracias a mis compañeros doctores por colaborar conmigo en las publicaciones.

Gracias a Pili, Dani y Jorge, gracias por vuestro apoyo incondicional y nutrirme cada día con vuestro amor. A Zore por tu buena energía y Yuli por tu fuerza y positividad. A mis sobrinos, Alexander, Ángela y Bézany por su alegría, muchas gracias Víctor por estar siempre ahí y al resto de mis seres queridos. A mis compañeros peludos Rama, Luna y Bagheera que se han pasado más horas que yo delante del ordenador y también se saben la Tesis. A mis amigos, David, Laura, Almu, Rita, Patri y Bea, por vuestro apoyo, comprensión y diversión. A mi amor, Abdou, por hacerme sonreír y que cada día sea más feliz.

Muchas gracias a las ranas que posaron de forma desinteresada durante la sesión de fotos, y a esa ranita que nos inspiró para demostrar que las cosas se pueden hacer de otra manera. Gracias a la naturaleza por brindarme la oportunidad de descubrir sus secretos.

Gracias a ti Mamá, es tu esencia, tu amor y tu fuerza lo que me nutre de energía todos los días. Eres la persona que lo ha hecho posible, muchas gracias.

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido	1
Acrónimos y Abreviaturas	3
Resumen	4
Introducción General	9
1. Animales y Muestreo.....	10
2. Área de Estudio.....	14
Objetivos.....	19
Capítulo I- Estructura de la Piel de la <i>R. temporaria</i> y su Relación con el Color	23
1. Resumen.....	23
2. Introducción	24
2.1 La Piel de los Anfibios	24
2.2 El Color de la Piel de los Anfibios.....	27
3. Material y Métodos.....	29
3.1 Material	29
3.2 Preparación de las Muestras.....	29
3.3 Observación mediante Técnicas de Microscopía	31
4. Resultados	32
4.1 MO	32
4.2 MET	40
5. Discusión	51
6. Conclusiones.....	57
Capítulo II. Función Adaptativa de la Piel de <i>R. temporaria</i> a la Alta Montaña.	59
1. Resumen.....	59
2. Introducción	59
3. Material y Métodos.....	62
3.1 Generalidades.....	62
3.2 Material	62
3.3 Preparación de las Muestras.....	63
4. Resultados	67
4.1 Descripción de la Ultraestructura de los Iridóforos en <i>R. temporaria</i>	67
4.2 Estudio de la Variabilidad en el Patrón de Distribución de los Iridóforos.....	67
4.3 Estudio de la Fluorescencia en los Iridóforos	70
5. Discusión	73
5.1 Caracterización y Organización Espacial de los Iridóforos en la Dermis.....	73
5.2 Los Patrones de Distribución de los Iridóforos.....	76
5.3 La Fluorescencia de los Iridóforos.....	77
6. Conclusiones.....	78
Capítulo III. Polimorfismos de Color en <i>R. temporaria</i>	79
1. Resumen.....	79
2. Introducción	79

3.	Material y Métodos.....	81
3.1	Animales y Muestreo.....	81
3.2	Análisis del Color	84
3.3	Análisis Estadístico	85
4.	Resultados	87
5.	Discusión	90
6.	Conclusiones.....	93
Capítulo IV. Patrón Dorsal de Manchas Oscuras en <i>R. temporaria</i>		95
1.	Resumen.....	95
2.	Introducción	96
3.	Material y Métodos.....	97
3.1	Animales y Muestreo.....	97
3.2	Obtención de imágenes digitales.....	100
3.3	Proceso de imágenes.....	100
3.4	Análisis Estadístico	101
4.	Resultados	101
5.	Discusión	106
6.	Conclusiones.....	109
Discusión		111
Conclusiones.....		117
Referencias.....		119
Lista de Tablas		137
Lista de Figuras.....		139
Lista de Apéndices.....		145
Apéndice 1.....		146
Apéndice 2.....		147
Lista de Anexos.....		151
Anexo 1		
Anexo 2		
Anexo 3		
Anexo 4		

Acrónimos y Abreviaturas

<i>Acrónimo</i>	<i>Definición</i>
ASW	Amphibian Species of the World
C. A. C. T. I.	Centro de Apoyo Tecnológico y Científico a la Investigación de la Universidad de Vigo
DI	Densidad de Iridóforos
MET	Microscopía electrónica de transmisión
Mc1r	Gen receptor de melanocortina 1
MIF	Factor inhibidor de la melanización
MO	Microscopía óptica
MSH	Hormona estimulante de los melanóforos
m s. n. m.	Metros sobre el nivel del mar
EWL	Pérdida de agua por evaporación
UV	Ultravioleta
SVL	Longitud del hocico a la cloaca

Resumen

Los anfibios se están extinguiendo a un ritmo muy acelerado y sin precedentes (Stuart et al., 2004; McCallum, 2007; Wake y Vredenburg 2008; Collins, 2010), este declive de las poblaciones de anfibios está asociado a una crisis de extinción masiva que conlleva a una pérdida de biodiversidad global (Collins, 2010; Barnosky et al., 2011). Los ecosistemas montañosos están fragmentados de forma natural, lo que genera interrupciones en la conectividad y el aislamiento de las poblaciones. Las poblaciones alpinas de anuros son especialmente vulnerables a los cambios ambientales debidos al cambio climático e impactos antrópicos (Bosch et al., 2007; Wake y Vredenburg, 2008; Rollins-Smith, 2017), siendo la monitorización de poblaciones vulnerables un elemento importante para comprender los factores que conducen al declive de los anfibios. La rana bermeja, *R. temporaria*, es la especie de anuro más extendida de Europa (Sillero et al., 2014). Esta Tesis Doctoral estudia la biogeografía de las poblaciones de *R. temporaria* que habitan en la vertiente sur del Pirineo Central entre 1500 y 2600 m s. n. m. en el límite de distribución de la especie en latitud y altitud.

El polimorfismo en el color y en el patrón dorsal están ampliamente extendidos entre los anfibios, reflejando la diversidad fenotípica de estos animales (Hoffman y Blouin, 2000; Miramontes-Sequeiros et al., 2018a). Estos colores y patrones dorsales están determinados por los cromatóforos, células del tegumento contenedoras de pigmentos específicos (Duellman y Trueb, 1994). En anfibios se diferencian tres tipos principales de cromatóforos, los melanóforos que sintetizan melanina almacenada en los melanosomas, los xantóforos que acumulan pteridinas en los pterinosomas y los iridóforos con guanina cristalizada que constituye las plaquetas reflectantes. Los pigmentos de melanóforos y xantóforos absorben la luz, mientras que la guanina de las plaquetas reflectantes la reflejan (Bagnara et al., 1968; Duellman y Trueb, 1994; Bagnara y Matsumoto, 2006; Ligon y McCartney, 2016). En la epidermis, capa más externa de la piel, se localizan melanóforos que depositan melanina

citocrina en los queratinocitos de su alrededor cuya acumulación constituye las manchas oscuras o melánicas del patrón dorsal (Hadley y Quevedo, 1966; Zuasti et al., 1998; Bagnara y Matsumoto, 2006). En la dermis, capa más interna de la piel localizada bajo la epidermis, los cromatóforos se distribuyen en capas, generalmente los xantóforos se localizan formando una capa en la cara más externa de la dermis junto a la membrana basal, debajo se encuentran los iridóforos y bajo ambos están los melanóforos dérmicos que emiten prolongaciones celulares que rodean a los otros cromatóforos (Bagnara, 1976). Así, cuando la luz incide en la superficie de una rana, la capa de xantóforos actúa como filtro y absorbe una parte de las longitudes de onda corta (azul-violeta) y el resto son dispersadas por las plaquetas reflectantes de los iridóforos. La melanina de los melanóforos absorbe las longitudes de onda larga (rojo-naranja). Como resultado, las longitudes de onda intermedia (amarillo-verde) pasan libres a través de los xantóforos y la mayoría son reflejadas por los iridóforos, apareciendo los animales de este color (Bagnara y Hadley, 1973). De manera que el color final del animal depende de factores como la morfología de la piel, y la cantidad y distribución de los distintos tipos de cromatóforos. Estos factores pueden variar dependiendo de la genética, la fisiología y el ambiente, reflejando la variabilidad fenotípica de las poblaciones.

El objetivo principal de esta Tesis es estudiar la biogeografía de las poblaciones de la rana bermeja (*R. temporaria*) en el Pirineo Central aragonés, los factores que afectan a su distribución y los mecanismos específicos de adaptación al ambiente. Para analizar la diversidad fenotípica de las poblaciones de la rana bermeja, se estudiaron el polimorfismo del color de la piel y del patrón dorsal de los individuos, así como la estructura de la piel y los factores que determinan su coloración.

Para realizar esta investigación se estudió la distribución espacial de las poblaciones alpinas de la rana bermeja (*R. temporaria*) en treinta localidades diferentes ubicadas en el Pirineo Central (vertiente ibérica) a altitudes comprendidas entre 1500 y 2600 m s. n. m. Las

campañas de muestreo se realizaron durante los veranos de 2014, 2016 y 2017 en expediciones realizadas a pie. Se realizaron fotografías digitales a un total de 372 individuos de *R. temporaria* pertenecientes a diferentes poblaciones localizados en dos tipos de cuerpos de agua, cuerpos de agua permanentes (lagos glaciares de aguas cálidas) y cuerpos de agua temporales (arroyos de aguas frías). Durante el muestreo se registraron propiedades del ambiente como la altitud, la geología, la insolación, la temperatura y la temporalidad de los cuerpos de agua. Conocer las características del área de estudio posibilita el análisis de los factores que afectan a la distribución de las poblaciones de anfibios que habitan en alta montaña.

A continuación se caracterizó la morfología de la piel de la *R. temporaria* alpina mediante técnicas histológicas, y se describieron las estructuras responsables de la formación del patrón dorsal de manchas oscuras y del color de la piel. La piel de la *R. temporaria* tiene la misma estructura que la descrita en anuros, una capa epitelial externa o epidermis y una capa interna de tejido conectivo o dermis. Los melanóforos epidérmicos son los cromatóforos responsables de la formación de las manchas del patrón dorsal, y los cromatóforos dérmicos (melanóforos, xantóforos e iridóforos) proporcionan el color base del animal. Las observaciones realizadas mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión revelan que aunque la ultraestructura de los tres tipos de cromatóforos es similar a la observada generalmente en anuros, la organización espacial de los cromatóforos dérmicos es diferente. Así, los iridóforos dérmicos de *R. temporaria* son muy numerosos y están apilados en varias capas de células localizadas bajo la capa de xantóforos, de forma similar a la descrita en el tegumento de algunas ranas africanas que habitan en ambientes áridos (Drewes et al., 1977; Kobelt y Linsenmair, 1986; Lampert y Linsenmair, 2002).

Este estudio prosigue con la caracterización de los iridóforos en la piel de la *R. temporaria* alpina, utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia confocal, para averiguar su función en la adaptación a las condiciones ambientales de la alta montaña. Los

resultados muestran que los iridóforos de la piel en la *R. temporaria* alpina disipan el exceso de energía de longitud de onda corta emitiendo fluorescencia. Se concluye que la presencia de un gran número de iridóforos junto a su capacidad de reflejar la radiación ultravioleta (UV) representa un mecanismo específico de termorregulación que actúa como fotoprotector frente a la dañina radiación UV, evitan el sobrecalentamiento de la piel y la pérdida de agua por evaporación (EWL). Por lo tanto, los iridóforos de la piel son un factor clave en la adaptación de los anfibios a ambientes de alta montaña.

Para analizar la diversidad fenotípica de las poblaciones de la rana bermeja, se estudiaron de forma independiente el polimorfismo del color del cuerpo del animal y la variabilidad en el grado de melanismo del patrón dorsal. El análisis del polimorfismo del color de las ranas se llevó a cabo desarrollando una técnica de estudio no invasiva que permite evaluar y clasificar la diversidad fenotípica de los individuos. Para ello se procesaron las imágenes de 372 ranas fotografiadas *in situ* en el área de estudio, y se analizaron las diferencias encontradas en la tipología del color de la piel, obteniendo cinco grupos o fenotipos. Seguidamente se analizó la relación entre la variabilidad fenotípica con variables ambientales, como la geología, la altitud, el tipo de cuerpo agua y el tamaño del individuo. Este análisis revela que la variabilidad del tipo de piel disminuye en las ranas que se desarrollaron en cuerpos de agua temporales respecto a las ranas cuyo desarrollo tuvo lugar en cuerpos de agua permanentes. Los resultados sugieren que una metamorfosis temprana de los renacuajos, como adaptación a la desecación del hábitat, puede tener efectos negativos en la diversidad fenotípica de los adultos. Por lo tanto, se demuestra que el acceso a cuerpos de agua permanentes es importante para evitar la pérdida de diversidad en poblaciones de anuros y reducir su vulnerabilidad frente a los impactos ambientales y los patógenos.

Finalmente se estudió el grado de melanismo del patrón dorsal de manchas oscuras de las poblaciones de *R. temporaria* objeto de estudio en el Pirineo Central. Para ello se

analizó la variación en la distribución de las manchas del patrón dorsal en imágenes digitales correspondientes a 372 individuos de *R. temporaria* fotografiados *in situ* en el área de estudio. Seguidamente se analizó la relación entre la variabilidad en el grado de melanismo y diferentes variables ambientales como la insolación, la altitud, la temporalidad de los cuerpos de agua y el tamaño del individuo. Este análisis resuelve que el grado de melanismo, la temporalidad de los cuerpos de agua y el tamaño de los individuos están correlacionados. La variación en el grado de melanismo de las poblaciones está vinculada a la temperatura del agua en los diferentes ambientes donde habitan las poblaciones alpinas de la *R. temporaria*. Así, las ranas localizadas en los cuerpos de agua temporales tienen mayor grado de melanismo que las ranas que se encuentran en los cuerpos de agua permanentes. Teniendo en cuenta que los individuos con patrones melánicos alcanzan temperaturas más elevadas cuando se exponen a la radiación solar (Vences et al., 2002; Clusella-Trullas et al., 2007), estos patrones dorsales oscuros resultan beneficiosos en las aguas frías de los arroyos (cuerpos de agua temporales) y viceversa, un patrón dorsal más claro evita el sobrecalentamiento en las cálidas aguas de los lagos glaciares (cuerpos de agua permanentes). Por lo tanto, se concluye que el grado de melanismo del patrón dorsal de manchas oscuras proporciona a las poblaciones alpinas *R. temporaria* un mecanismo de termorregulación y de mimetismo inducido por el ambiente.

Palabras clave. Anuro, Cromatóforos, Patrón dorsal, Plasticidad fenotípica, Polimorfismo de color, Termorregulación

Introducción General

Los anfibios se están extinguiendo a un ritmo muy acelerado y sin precedentes (Stuart et al., 2004; McCallum, 2007; Wake y Vredenburg 2008; Collins, 2010), siendo más vulnerables que otros grupos de vertebrados como los mamíferos y las aves (Stuart et al., 2004; Wake y Vredenburg 2008), se calcula que una tercera parte o más de las 6300 especies de anfibios están en amenaza de extinción, generando una gran preocupación (Stuart et al., 2004; McCallum, 2007; Wake y Vredenburg, 2008). Al mismo tiempo, los anfibios de todo el mundo se enfrentan a un fuerte estrés ambiental, siendo especialmente vulnerables a la contaminación ambiental (Collins, 2010), a los impactos antrópicos en el ecosistema (Wake y Vredenburg, 2008), al cambio climático y a las enfermedades infecciosas emergentes de origen fúngico, como la quitridiomycosis, o vírico como las enfermedades producidas por ranavirus (Collins, 2010; Rollins-Smith, 2017).

Estudios recientes confirman que las tasas de extinción de especies actuales son mucho mayores que las tasas de fondo (McCallum, 2007; Barnosky et al., 2011) y que la pérdida de especies amenazadas conlleva a una crisis de extinción masiva caracterizada por una pérdida de biodiversidad global (Collins, 2010; Barnosky et al., 2011).

La biogeografía estudia los procesos que determinan a escala espacial y temporal la distribución de los organismos en la Tierra. Esta ciencia intenta documentar y comprender los patrones de diversidad biológica, desde los genes hasta comunidades y ecosistemas, y su variación a través de gradientes geográficos, incluyendo los de área, aislamiento, latitud, altitud y profundidad (Lomolino et al., 2016). La biogeografía también investiga los factores ecológicos, ambientales e históricos que definen la localización de la biodiversidad y su diferenciación entre regiones. Una región geográfica está delimitada por características físicas, como son el agua, las montañas o el clima. Los límites entre regiones pueden no estar bien definidos y ser un amplio gradiente de características físicas entre regiones vecinas (Helmus y Behm, 2020).

En términos de biogeografía, las montañas se caracterizan por propiedades ambientales distintivas fundamentales que determinan la distribución de los organismos, como son el gradiente y límite altitudinal, las variaciones topográficas, el aislamiento espacial y la falta de conectividad. La biogeografía de montaña intenta resolver la problemática del cambio climático, las perturbaciones humanas y la conservación de las especies (Shen, 2017).

La rana bermeja o rana común europea, *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 (familia Ranidae), es la especie de anfibio anuro más extendida en Europa (Sillero et al., 2014). Esta especie habita humedales en el norte de la península ibérica y está bien representada en la vertiente sur del Pirineo Central entre los 1500 y 2600 m s. n. m., hábitat de las poblaciones objeto de estudio de esta Tesis.

El estudio de poblaciones alpinas puede resultar complicado debido al difícil acceso y aislamiento de su hábitat. Esta Tesis pretende contribuir a la conservación de la biodiversidad desarrollando un método de estudio no invasivo que permita caracterizar poblaciones vulnerables de anfibios *in situ*, sin manipulaciones agresivas.

1. Animales y Muestreo

En este trabajo se investiga la distribución espacial de las poblaciones de la *R. temporaria* (Figura 1) en el Pirineo Central (Figura 2). El área de estudio se localiza a una altitud entre 1500 y 2600 m s. n. m., en las proximidades a la senda pirenaica GR-11 que atraviesa la cordillera de los Pirineos en el límite norte de la Península Ibérica, Andorra y Francia (Figura 3). Los datos necesarios para desarrollar esta Tesis se recolectaron durante campañas de muestreo, efectuadas entre finales de julio y principios de agosto de 2014, 2016 y 2017, en expediciones realizadas a pie.



Figura 1 La rana bermeja, *R. temporaria*, habita en humedales del Pirineo Central.

Distribución de poblaciones de la R. temporaria

Se registró la presencia y ausencia de individuos de *R. temporaria* y su estadio de desarrollo (puestas, renacuajos, juveniles, subadultos y adultos) en diferentes ambientes, y se estudiaron las posibles barreras físicas geológicas y antrópicas que impiden la dispersión de las ranas hacia otros valles.

Descripción del paisaje

Se estudió la geomorfología del área de estudio. En cada punto de muestreo se realizaron fotografías georreferenciadas registrando las coordenadas geográficas y la altitud.

Caracterización de la flora

Se estudiaron las especies florísticas y sus estados fenológicos. Las plantas se fotografiaron e identificaron utilizando claves de determinación de flora alpina (Grey-Wilson y Blamey, 1980), también se registró su localización.



Figura 2 *Vista panorámica del Pirineo Central.* Se observa el aislamiento del área de estudio y la complejidad del paisaje. Los lagos glaciares se localizan a una altitud de 2000 a 2600 m s. n. m.

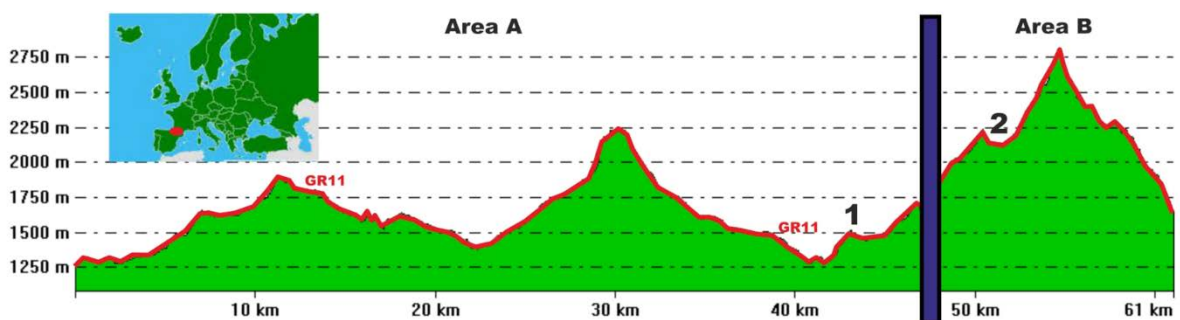


Figura 3 *Perfil del Área de estudio.* Se visualiza el perfil de altitud de la senda pirenaica GR-11 que cruza la cordillera de los Pirineos al límite norte de la Península Ibérica, Andorra y Francia. Las localidades muestreadas se localizan en las proximidades del recorrido de esta senda distribuidas en dos áreas con diferente geomorfología. El Área A representa las localidades situadas entre 1500 y 1800 m s. n. m. y el Área B las ubicadas entre 2000 y 2600 m s. n. m. El punto 1 indica la ubicación de las Charcas de Formigal subiendo a Anayet (Área A) y el punto 2 la localización del Ibón de las Ranas en Respomuso (Área B), en ambos puntos (1 y 2) se situaron dispositivos de registro de temperatura tipo “Datalogger iButton”.

Caracterización de los cuerpos de agua

Se registró la temperatura atmosférica y la temperatura de los diferentes cuerpos de agua en ubicaciones fijas (Figura 3). Para ello, en cada localidad se colocaron entre cinco y diez dispositivos tipo "Datalogger iButton" que recopilaban datos durante un periodo de seis años. También se midió el tamaño de los cuerpos de agua con un medidor láser y la salinidad del agua con un medidor de salinidad PCE-0100. Se observa que los cuerpos de agua donde habita la rana bermeja alpina pueden ser de dos tipos, permanentes o temporales. Los cuerpos de agua permanentes son lagos de origen glaciar denominados ibones, generalmente reciben suministro de agua durante todo el año y son de mayor tamaño que los cuerpos de agua temporales. Los cuerpos de agua temporales son lagunas y arroyos, más pequeños que los cuerpos de agua permanentes y se originan a partir de fuentes.

Registro de la Radiación

La radiación ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) se midió en diferentes puntos de muestreo utilizando un medidor de luz UV portátil Fagney UV 340B con una sensibilidad 290 a 390 nm.

Caracterización de los individuos

Con el fin de desarrollar un método de estudio no invasivo que permita estudiar el polimorfismo del color y analizar la variabilidad fenotípica de poblaciones vulnerables en su hábitat, se fotografiaron *in situ* 373 individuos de *R. temporaria*, también se registró su tamaño y estado de madurez sexual.

Periodo de muestreo

El análisis de nuestros datos y las observaciones de Balcells (1975) nos permitieron definir y ajustar el periodo de muestreo teniendo en cuenta el ciclo biológico de la *R. temporaria* en cada una de las áreas estudiadas. En el Área A, a menor altitud, el periodo de

hibernación comienza en noviembre y finaliza a mediados de marzo. En ese momento empieza la época de reproducción que dura desde mediados de marzo hasta finales de abril. En el Área B, a mayor altitud, el periodo de hibernación se extiende durante dos meses más (hasta finales de mayo) debido a la acumulación de nieve y retraso del inicio de la primavera. Consecuentemente, la época de reproducción empieza a mediados de mayo y se extiende hasta finales de junio (Figura 4). Debido a que los individuos adultos de *R. temporaria* pueden cambiar de color durante la época de reproducción (Bell y Zamudio, 2012), para evitar las posibles alteraciones en el color de los individuos, los muestreos se realizaron entre finales de julio y principios de agosto transcurridos al menos 15 días tras la época de reproducción en ambas áreas.

2. Área de Estudio

Los ecosistemas montañosos están naturalmente fragmentados generando aislamiento e interrupción en la conectividad entre las poblaciones. Las poblaciones alpinas de anuros son especialmente susceptibles a la introducción de especies invasoras (Knapp y Matthews, 2000), a las epidemias y al estrés ambiental debido al cambio climático (Bosch et al., 2007; Rollins-Smith, 2017). Esta vulnerabilidad está correlacionada con la plasticidad fenotípica geográfica, la aclimatación y el comportamiento termorregulador de las poblaciones de anfibios (Enriquez-Urzelai et al., 2020). El estudio de especies vulnerables en su entorno es una labor importante si queremos comprender los factores que conducen al descenso de las poblaciones de anfibios. En esta sección se caracteriza el área de estudio dónde habitan las poblaciones de rana bermeja (*R. temporaria*) de la ladera sur del Pirineo Central aragonés. Los datos utilizados para este análisis se recolectaron durante los muestreos realizados en 2014, 2016 y 2017 (véase sección 1.4).

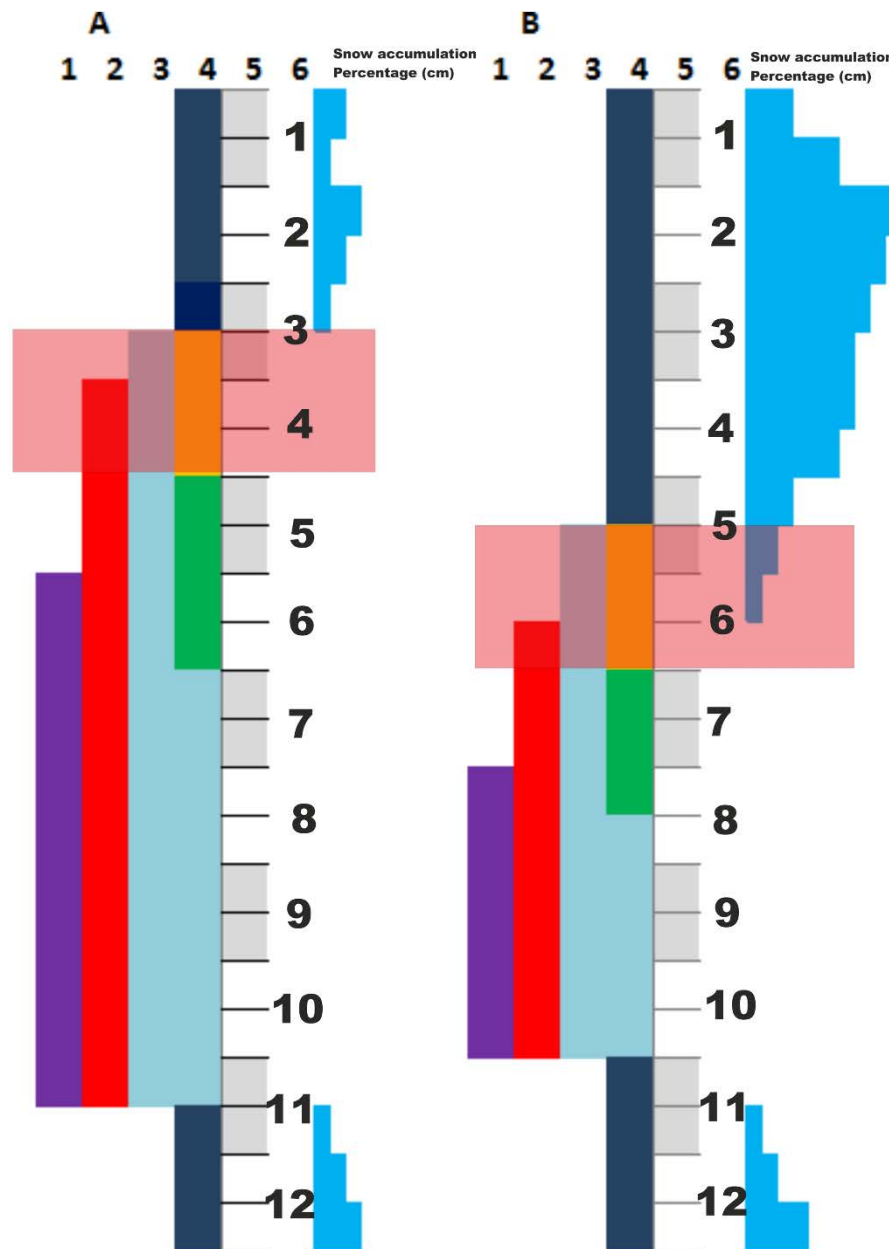


Figura 4 *Ciclo biológico de la R. temporaria en el Área A y el Área B.* Los colores representan los estadios de desarrollo en columnas: violeta - estadios juveniles (columna 1), rojo – subadultos (columna 2), azul claro - adultos (columnas 3 y 4), verde - renacuajos (columna 4), naranja - puestas (columna 4), azul oscuro - periodo de hibernación (columna 4). La columna 5 representa los meses divididos en quincenas. La columna 6 muestra el porcentaje de nieve acumulada en cada mes. Los cuadrados de color rojo claro representan los periodos de apareamiento. Los diagramas se elaboraron a partir de nuestros muestreos y las observaciones de Balcells (1975).

Las poblaciones de rana bermeja alpina se distribuyen en dos tipos de área geomorfológica en la ladera sur del Pirineo Central aragonés: El Área A (Aguas Tuertas –

Portalet) reúne las localidades situadas entre 1500 y 1800 m s. n. m. con una altitud media de 1600 m s. n. m., y el Área B (Formigal - Bachimaña) a las localidades situadas entre 2000 y 2600 m s. n. m. con una altitud media de 2400 m s. n. m. (Figura 3). El Área A se corresponde con la zona geomorfológica 1, donde predominan las rocas metamórficas (pizarras y calizas) y sedimentarias (areniscas). En las sierras de roca caliza se observa un paisaje kárstico con dolinas donde se acumula el agua originando lagos colmatados. También se observan brechas de glaciares antiguos y derrubios de morrenas. El Área B se corresponde con la zona geomorfológica 2, donde predominan las rocas ígneas (granitos). En esta área se localizan generalmente los lagos glaciares.

Las ranas tienen limitada su dispersión debido a barreras físicas naturales o antrópicas. Los individuos adultos pueden desplazarse a través de las praderas que comunican los diferentes valles y remontar cursos de agua, y tanto adultos como renacuajos pueden descender por los riachuelos. Sin embargo no pueden evitar determinadas barreras físicas geológicas como la pendiente, barrancos, roquedos y canchales. También se observan barreras antrópicas que destruyen el hábitat e impiden la dispersión directa de los individuos, como son los embalses, como es el caso del Embalse de Respomuso situado en el Bal de Tena a 2200 m s. n. m., y los aparcamientos o carreteras, que no impiden el tránsito de los anfibios pero aumentan el riesgo de atropello y la exposición ante los depredadores, como es el caso de la Pista de fondo de Formigal localizada a 2047 m s. n. m. en el Bal de Tena. En algunos lagos, como en el Ibón de Escalar localizado a 2063 m s. n. m. en el Bal del Aragón, se ha facilitado el acceso a los seres humanos mediante la instalación de telesillas, y se han introducido de manera artificial peces en el ibón. En estos lagos, los peces se alimentan de las ranas y renacuajos, desplazando a las poblaciones de anfibios a pequeños cursos de agua y zonas encharcadas donde los peces no sobreviven.

El Pirineo Central aragonés, exhibe una gran biodiversidad de especies florísticas adaptadas a la alta montaña, las cuales fueron identificadas y fotografiadas. Estos datos se utilizaron para elaborar un atlas de flores de alta montaña que hemos publicado en Palanca-Soler y Caamaño-Chinchilla (2020), véase Anexo 4.

La rana bermeja alpina habita en cuerpos de agua que son de naturaleza permanente o temporal. Los cuerpos de agua permanentes son lagos que se alimentan de los glaciares (ibones) y generalmente reciben suministro de agua durante todo el año, tienen aguas más cálidas y son de mayor tamaño que los cuerpos de agua temporales. Los cuerpos de agua temporales se originan a partir de fuentes de agua que brotan formando arroyos y humedales, tienen aguas más frías y son más pequeños que los permanentes. Estos ambientes se caracterizan por la presencia de musgos de turbera (*Sphagnum sp.*), la cespitosa *Nardus stricta*, y la planta carnívora *Pinguicula grandiflora*. Cuando las charcas y cursos de agua se secan, se forman recovecos y galerías húmedas que las ranas utilizan para resguardarse.

El ciclo biológico de la rana bermeja cambia dependiendo del área de distribución (Área A y Área B) (Figura 4). En las poblaciones que habitan a altitudes más bajas, entre 1500 y 1800 m s. n. m. (Área A), el periodo de hibernación comprende desde mediados de noviembre hasta mediados de marzo, coincidiendo con el deshielo y las primeras floraciones. En ese momento, los individuos adultos inician una búsqueda activa de alimento y comienza la época de apareamiento y de puestas que dura hasta finales de abril. Los subadultos, empiezan su actividad a principios de abril. Los primeros renacuajos se observan a principios de mayo. Durante los meses estivales, juveniles, subadultos y adultos buscan alimento hasta que empiezan a bajar las temperaturas y con la llegada de las primeras nevadas de noviembre, comienzan un nuevo periodo de hibernación. En las poblaciones que habitan a mayor altitud, entre 2000 y 2600 m s. n. m. (Área B), el periodo de hibernación dura dos meses y medio más respecto a altitudes más bajas debido a una mayor acumulación de nieve. La hibernación se inicia a mediados de noviembre y se extiende hasta finales de mayo coincidiendo con el deshielo y la llegada de la primavera. La época de reproducción y de puestas comprende desde mediados de mayo hasta finales de junio, apareciendo los primeros renacuajos a principios de julio.

Conocer las características del área de estudio nos va a permitir analizar los factores que afectan a la distribución de las poblaciones de anfibios que habitan en alta montaña.

Objetivos

Esta Tesis tiene como objetivo principal estudiar la biogeografía de las poblaciones de la rana bermeja (*R. temporaria*) en el Pirineo Central aragonés, los factores que afectan a su distribución y los mecanismos específicos de adaptación al ambiente. Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Estudiar la distribución espacial de las poblaciones alpinas de la rana bermeja (*R. temporaria*) en el Pirineo Central aragonés. Caracterizar el área de estudio, considerando el paisaje y los tipos de ambientes donde habita la rana bermeja.

Objetivo 2. Caracterizar la morfología de la piel de la *R. temporaria* alpina mediante técnicas histológicas, y describir las estructuras responsables de la formación del patrón dorsal de manchas oscuras y del color de la piel.

Objetivo 3. Estudiar los mecanismos específicos que permiten a los anfibios adaptarse a la alta montaña. Caracterizar los iridóforos de la piel en la *R. temporaria* alpina e investigar su función en la adaptación a la alta montaña.

Objetivo 4. Desarrollar un método de estudio no invasivo que permita caracterizar poblaciones vulnerables de anfibios *in situ* en ambientes alpinos de difícil acceso y estudiar si el polimorfismo de color puede ser medido y utilizado como una herramienta para caracterizar la variabilidad fenotípica. Una vez desarrollado el método, estudiar la variabilidad fenotípica de poblaciones de *R. temporaria* fotografiadas *in situ* en el Pirineo Central aragonés y analizar la relación de la variabilidad fenotípica con variables ambientales.

Objetivo 5. Caracterizar el patrón dorsal de manchas oscuras en poblaciones alpinas de *R. temporaria* e investigar la relación entre la variabilidad en el grado de melanismo del patrón dorsal de manchas con variables ambientales.

Esquema de la Tesis

Esta Tesis Doctoral está estructurada en una introducción general, cuatro capítulos, una discusión y conclusiones. Determinadas secciones de esta Tesis, han sido reestructuradas para su publicación (véase en Anexos).

Introducción General. En esta sección se describe la situación actual de los anfibios a nivel global, se definen los objetivos de esta Tesis y se caracteriza el área de estudio de la rana bermeja en el Pirineo Central aragonés (objetivo 1).

Capítulo I. Estructura de la Piel de la R. temporaria Alpina y su Relación con el Color. En este capítulo se caracteriza la morfología general de la piel de la *R. temporaria* alpina utilizando técnicas histológicas, y se estudian las estructuras responsables de la formación del patrón dorsal de manchas oscuras y del color de la piel (objetivo 2). Se identifican los iridóforos como principal modificación morfológica de adaptación a la alta montaña.

Capítulo II. Función Adaptativa de la Piel de R. temporaria a la Alta Montaña. En este capítulo se describe cómo los iridóforos de la piel en la *R. temporaria* alpina disipan el exceso de energía de longitud de onda corta emitiendo fluorescencia. Este mecanismo específico desempeña un papel crucial en la supervivencia de la especie en este entorno extremo, actuando como fotoprotección frente a la dañina radiación ultravioleta (UV) y evitando el sobrecalentamiento de la piel (objetivo 3).

Capítulo III. Polimorfismo de Color en R. temporaria. En este capítulo, se desarrolla un nuevo método de análisis no invasivo aplicable *in situ* que permite evaluar y clasificar el polimorfismo del color de las ranas muestreadas en el área de estudio y así estudiar la variabilidad fenotípica. Se analiza la relación entre la variabilidad fenotípica y diferentes factores ambientales (objetivo 4).

Capítulo IV. Patrón Dorsal de Manchas Oscuras en R. temporaria. En este capítulo, se caracteriza el patrón dorsal de manchas oscuras en la *R. temporaria*, y se

investiga la relación entre la variabilidad en el grado de melanismo en el patrón dorsal de manchas oscuras con diferentes variables ambientales y propias del individuo (objetivo 5).

Discusión

Conclusiones

Capítulo I- Estructura de la Piel de la *R. temporaria* y su Relación con el Color

1. Resumen

En este trabajo se caracteriza la morfología general de la piel de la *R. temporaria* y las estructuras responsables de la formación del patrón dorsal de manchas oscuras y del color del cuerpo utilizando técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión. Los individuos estudiados pertenecen a poblaciones de alta montaña en el Pirineo Central aragonés (España). Se concluye que la piel de la *R. temporaria* tiene una estructura similar a la descrita generalmente en anuros. En ella se ubican tres tipos de cromatóforos, células contenedoras de orgánulos con pigmentos específicos, cuya ultraestructura se asemeja a la observada en anuros: los xantóforos incluyen pterinosomas, los iridóforos presentan plaquetas reflectantes y los melanóforos contienen melanosomas. Los xantóforos y los iridóforos se localizan en la dermis, mientras que los melanóforos se localizan en la dermis y/o en la epidermis mostrando diferente función. Se observa que los melanóforos epidérmicos depositan melanina citocrina en los queratinocitos de su alrededor que constituyen las manchas oscuras que forman el patrón dorsal, y que a diferencia de la piel dorsal, la piel ventral carece de patrón de pigmentación. La organización espacial de los cromatóforos en la dermis (xantóforos, iridóforos y melanóforos) define el color base del cuerpo del animal. Estos cromatóforos tienen un ordenamiento espacial diferente al descrito generalmente en anuros, siendo importante resaltar que la distribución de los iridóforos dérmicos es similar a la que presenta una rana que habita en la sabana africana. Estos resultados sugieren que la distribución de los iridóforos es una adaptación morfológica del tegumento de la *R. temporaria* a las condiciones ambientales de la alta montaña, siendo necesario continuar la investigación para averiguar su función (véase capítulo II).

Palabras clave. Tegumento, Cromatóforos, Patrón dorsal, Polimorfismo de color, Microscopía óptica, Microscopía electrónica de transmisión

2. Introducción

Los anfibios, grupo de vertebrados pionero en conquistar el medio terrestre, desarrollaron estructuras tegumentarias que los diferencian de los peces para adaptarse al ambiente. La piel, tegumento externo de los vertebrados (Duellman y Trueb, 1994), en anfibios se caracteriza por la queratinización de su superficie, la presencia de glándulas pluricelulares y por el desarrollo de un proceso de muda periódico (Andrew, 1959; Ling, 1972; Duellman y Trueb, 1994). A diferencia de otros vertebrados tetrápodos, carece de estructuras epidérmicas como escamas, piel o plumas (Andrew, 1959; Duellman y Trueb, 1994). Estas adaptaciones permiten a los anfibios mantener el balance hídrico y utilizar la piel como una barrera de protección mecánica y química entre el medio interno del organismo y su ambiente. La piel actúa como una superficie de intercambio de gases y agua, importante para la respiración cutánea, la osmorregulación y la termorregulación (Andrew, 1959; Parakkal y Matoltsy, 1964; Ling, 1972; Brown et al., 1981; Toledo y Jared, 1993; Duellman y Trueb, 1994; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998). Los anfibios están ampliamente distribuidos por todos los continentes y la mayoría de las islas oceánicas, a excepción de la Antártida (Bentley, 1966). Los detalles morfológicos de las estructuras de la piel están relacionados con la fisiología de adaptación al hábitat, varía dependiendo de la región del cuerpo y proporcionan la apariencia general de los anfibios (Felsemburgh et al., 2007, 2009).

2.1 La Piel de los Anfibios

La piel de los anfibios adultos está formada por dos capas principales: la epidermis, capa de tejido epitelial en contacto con el exterior, y la dermis, capa subyacente constituida por tejido conectivo (Andrew, 1959; Voûte, 1963; Farquhar y Palade, 1964; Blaylock et al., 1976; Toledo y Jared, 1993; Duellman y Trueb, 1994; Greven et al., 1995; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998; Azevedo et al., 2005, 2007; Felsemburgh et al., 2007, 2009).

La Epidermis

La epidermis es un epitelio estratificado plano de origen ectodérmico, cuyo número de capas varía según la especie y la región del cuerpo (Farquhar y Palade, 1964; Parakkal y Matoltsy, 1964; Blaylock et al., 1976; Duellman y Trueb, 1994; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998; Felsemburgh et al., 2007). Se distinguen dos estratos: el estrato córneo y el estrato germinativo.

Estrato córneo. Es la capa más superficial de la epidermis de los anfibios, en anuros está formada por una o dos capas de células escamosas queratinizadas o parcialmente queratinizadas (Andrew, 1959; Voûte, 1963; Farquhar y Palade, 1964; Parakkal y Matoltsy, 1964; Toledo y Jared, 1993; Duellman y Trueb, 1994). Estas células queratinizadas presentan en su citoplasma haces de filamentos de queratina, llamados tonofilamentos, que forman una doble red reforzada horizontal (Voûte, 1963; Farquhar y Palade, 1964; Parakkal y Matoltsy, 1964; Blaylock et al., 1976; Le Quang-Trong y Bouligand, 1976; Duellman y Trueb, 1994). Durante la queratinización, los queratinocitos experimentan un proceso de secamiento y endurecimiento, y posteriormente se produce el desprendimiento de la superficie de la epidermis o muda (Andrew, 1959; Voûte, 1963).

El estrato germinativo. Se localiza entre la membrana basal y el estrato córneo y está formado por una sucesión de 4 a 8 capas de células (Andrew, 1959; Voûte, 1963; Toledo y Jared, 1993; Duellman y Trueb, 1994; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998; Felsemburgh et al., 2007). En este estrato predominan los queratinocitos, aunque también se localizan otros tipos celulares como los melanóforos de la epidermis (Hadley y Quevedo, 1966; Zuasti et al., 1998; Bagnara y Matsumoto, 2006).

La Dermis

La dermis consiste en una capa de tejido conectivo donde la distribución espacial de las fibras de colágeno permite distinguir dos estratos: el estrato esponjoso y el estrato compacto. Bajo la dermis se localiza el tejido subcutáneo o hipodermis, constituida por tejido

conectivo laxo vascularizado con vasos sanguíneos, nervios y grandes espacios linfáticos (Elkan, 1968; Toledo y Jared, 1993).

El estrato esponjoso. Es la capa más externa de la dermis y se localiza bajo la membrana basal de la epidermis. Está formado por tejido conectivo laxo con fibras entrelazadas, cromatóforos, fibroblastos, fibras nerviosas, capilares, las glándulas dérmicas y a veces cantidades variables de músculo liso (Voûte, 1963; Toledo y Jared, 1993; Duellman y Trueb, 1994; Greven et al., 1995; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998; Azevedo et al., 2005, 2007; Felsemburgh et al., 2007, 2009).

Las glándulas dérmicas son exocrinas y difieren en tamaño, estructura y la naturaleza de su secreción es de naturaleza mucosa o serosa (Andrew, 1959; Duellman y Trueb, 1994; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998). Estas glándulas tienen la porción secretora rodeada de células mioepiteliales, cuya contracción colapsa el lumen del acino y del conducto, facilitando la secreción y liberando su contenido (Mills y Prum, 1984; Felsemburgh et al., 2009; Moreno-Gómez et al., 2014). Las glándulas mucosas son más numerosas y de menor tamaño que las glándulas serosas, y están ampliamente distribuidas por el tegumento. La secreción que producen actúa como lubricante cuando las ranas están en el agua y mantiene la humedad de la piel cuando están en tierra (Els y Henneberg, 1990; Duellman y Trueb, 1994; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998). Las glándulas serosas tienden a estar agregadas en sitios específicos y producen una secreción de apariencia lechosa y generalmente de naturaleza venenosa o irritante (Andrew, 1959; Duellman y Trueb, 1994).

El estrato compacto. Esta capa se localiza subyacente al estrato esponjoso y limita con la hipodermis. Está constituida por tejido conectivo denso donde las fibras de colágeno forman haces compactos que se disponen en series de capas alternativas paralelas a la superficie del cuerpo (Voûte, 1963; Toledo y Jared, 1993; Duellman y Trueb, 1994; Greven et al., 1995; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998; Azevedo et al., 2005, 2007; Felsemburgh et al., 2007, 2009). Este estrato no es continuo, sino que está atravesado por

haces perforantes que comunican la hipodermis con el estrato esponjoso (Elkan, 1968; Deneffe et al., 1993; Greven et al., 1995; Felsemburgh et al., 2007, 2009).

2.2 El Color de la Piel de los Anfibios

El polimorfismo del color y el patrón dorsal están ampliamente distribuidos entre anuros. Este fenómeno se utiliza como método de estudio de la variación fenotípica en estos animales (Hoffman y Blouin, 2000). La *R. temporaria* muestra una importante variación en el color y en el patrón dorsal entre y dentro de las poblaciones (Riobo et al., 1999; Arnold, 2002; Vences et al., 2002; Alho et al., 2010; Herczeg et al., 2010; Miramontes-Sequeiros et al., 2018a). Estos colores y patrones dorsales están determinados por células del tegumento que contienen pigmentos específicos, los cromatóforos (Duellman y Trueb, 1994). En anfibios hay tres tipos principales de cromatóforos: los melanóforos, los xantóforos y los iridóforos.

Los melanóforos son células de morfología dendrítica que sintetizan y almacenan melanina, polímero complejo derivado de tirosina y proteína, en un orgánulo llamado melanosoma (Bagnara, 1976; Zuasti et al., 1998; Marks y Seabra, 2001). Los melanóforos se localizan en la epidermis y en la dermis, y presentan diferencias citológicas y fisiológicas según su localización (Bagnara, 1976; Zuasti et al., 1998; Aspengren et al., 2006), los primeros participan en cambios lentos o morfológicos de color y los segundos en cambios rápidos o fisiológicos (Bagnara, 1976; Aspengren et al., 2006). Los melanóforos de la epidermis depositan melanina citocrina en los queratinocitos de su alrededor, estos depósitos de melanina forman las manchas oscuras o melánicas del patrón dorsal (Hadley y Quevedo, 1966; Zuasti et al., 1998; Bagnara y Matsumoto, 2006). Generalmente, la piel ventral de muchos anfibios tiene una apariencia más clara que la piel dorsal (Rudh et al., 2013), esto se debe a que en la región ventral se localiza y expresa un factor inhibidor de la melanización que suprime la melanización y mantiene los patrones de pigmentación dorsoventrales (Fukuzawa y Ide, 1988; Fukuzawa y Bagnara, 1989; Fukuzawa et al., 1995).

Los cromatóforos de la dermis, xantóforos, iridóforos y melanóforos, generalmente se asocian en capas de células contiguas que constituyen la unidad dérmica del cromatóforo. Esta estructura funciona como una unidad morfológica, fisiológica y funcional (Bagnara et al., 1968), donde los xantóforos están en contacto con la membrana basal, los iridóforos se localizan debajo de los xantóforos y los melanóforos se localizan directamente bajo los iridóforos. Los melanóforos dérmicos tienen prolongaciones citoplasmáticas dendríticas que rodean al resto de los cromatóforos (Bagnara et al., 1968; Bagnara, 1976).

Los principales pigmentos de los xantóforos son las pteridinas y los carotenoides (Bagnara, 1966; Frost y Robinson, 1984). Las pteridinas son sintetizadas por los xantóforos y se almacenan en orgánulos formados por lamelas concéntricas llamados pterinosomas (Matsumoto, 1965; Yasutomi y Hama, 1971, 1976; Bagnara, 1976). Los carotenoides son pigmentos liposolubles que se adquieren en la dieta y se almacenan en forma de vesículas en el interior de la célula (Obika, 1963; Bagnara, 1976; Umbers et al., 2016), los cromatóforos que acumulan carotenoides en su citoplasma también se denominan eritróforos (Bagnara y Matsumoto, 2006; Ligon y McCartney, 2016).

Los iridóforos presentan orgánulos con forma de plaqueta que contienen pigmentos que reflejan la luz desde su superficie, denominados plaquetas reflectantes, y organizados en pilas en el citoplasma. En anfibios, estos pigmentos son depósitos cristalinos de purinas como la guanina, la hipoxantina y la adenina (Bagnara, 1966; Taylor, 1969; Bagnara y Matsumoto, 2006).

Los colores de la piel son el resultado de la ordenación particular de los cromatóforos y de sus proporciones relativas (Lyerla y Jameson, 1968; Grether et al., 2004). Cuando la luz alcanza la superficie de una rana verde, una parte de las longitudes de onda corta (azul - violeta) son absorbidas por la capa de xantóforos y la otra parte son dispersadas por las plaquetas reflectantes que se encuentran en el interior de los iridóforos. Las longitudes de onda larga (rojo - naranja) atraviesan ambas capas (de xantóforos e iridóforos) y son absorbidas por la melanina de los melanóforos. Las longitudes de onda intermedia (amarillo

- verde) atraviesan la capa de xantóforos y son reflejadas por los iridóforos, mostrándose los animales de color verde (Bagnara y Hadley, 1973).

El objetivo de este trabajo es caracterizar la morfología general de la piel de la *R. temporaria* alpina utilizando técnicas histológicas, y describir las estructuras responsables de la formación del patrón dorsal de manchas oscuras y del color de la piel.

3. Material y Métodos

3.1 Material

Los ejemplares de rana bermeja utilizados en esta investigación pertenecen a la Colección de la Fundación Laboratorio de Anatomía Animal. Estos fueron recolectados durante el mes de agosto en el Pirineo Central aragonés en poblaciones localizadas en el límite meridional de su distribución en altitudes comprendidas entre 1500 y 2600 m s. n. m.

Se estudió la estructura de la piel en nueve muestras de tejido correspondientes a cinco ranas completamente metamorfoseadas con un tamaño SVL comprendido entre 2,0 y 5,0 cm. Se seleccionaron tres tipos de área de piel: áreas de piel dorsal con manchas melánicas, áreas de piel dorsal sin manchas y áreas de piel ventral (Tabla 1). Utilizando una cuchilla se tallaron nueve fragmentos de piel (1 mm x 3 mm) para su procesamiento. Todo el procesamiento de las muestras y posterior observación fue realizado en las instalaciones disponibles en el Servicio de Microscopía Electrónica del C. A. C. T. I. (Centro de Apoyo Tecnológico y Científico a la Investigación de la Universidad de Vigo).

3.2 Preparación de las Muestras

La preparación de las muestras de piel para su observación mediante técnicas de microscopía se realizó en tres pasos: a) Fijación del tejido, b) Inclusión del tejido en bloques de resina, c) Corte de los bloques y procesamiento de las secciones según la técnica de observación.

a) Proceso de fijación. Los fragmentos de piel se rehidrataron en series de etanol (90, 80, 70, 50, 30 y 15 %) durante 30 min por cada dilución a 4° C. Para desarrollar este protocolo experimental, se adaptó el protocolo estándar para el estudio de la piel de anfibios establecido por Bagnara et al. (1968). Los tejidos se fijaron durante 2 h en glutaraldehído al 6 % en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,2) y post-fijaron durante 5 h en tetróxido de osmio al 2 % en el mismo tampón. Tras la fijación, se procedió a la deshidratación en series de etanol (50, 75, 90, 95 y 100 %) durante 2 h en cada dilución a 4° C.

b) Inclusión en bloques de resina. Las muestras de piel se sumergieron en diluciones en serie ascendente de resina Epon en óxido de propileno (1:3 v/v, 1:1 v/v, 3:1 v/v), se realizaron 3 repeticiones en cada dilución, durante 2 h a 4° C y utilizando un rotor de agitación. A continuación, se sumergieron en Epon puro durante 3 h a temperatura ambiente (utilizando el rotor de agitación) y durante 30 min a 60° C (sin rotor de agitación). Finalmente, se polimerizaron las muestras durante 48 h a 60° C.

c) Corte de los bloques y procesamiento de las secciones. Se cortaron secciones transversales semifinas (0,70 µm) de los nueve bloques de resina (E1-1, E2-1, E3-1, E3-2, E3-3, E4-1, E4-2, E5-1 y E5-2) utilizando un ultramicrotomo Reichert Ultracut S con cuchilla de vidrio. Estas secciones semifinas se tiñeron con azul de metileno para su observación con microscopía óptica. Este protocolo de preparación de muestras preserva los cristales de guanina (Bagnara et al. 1968; Saenko et al. 2013; Teyssier et al. 2015).

Para las observaciones con microscopía electrónica de transmisión (MET) se seleccionaron los bloques E5-1, E4-1, E4-2 y E3-3. En primer lugar, las secciones semifinas de los bloques seleccionados se observaron con el microscopio óptico y se delimitó el área de estudio a analizar por MET. A continuación, se cortaron secciones transversales ultrafinas (70-90 nm) del área seleccionada utilizando un ultramicrotomo Reichert Ultracut S con cuchilla de diamante. Las secciones ultrafinas se montaron sobre rejillas recubiertas con Formvar y se contrastaron con acetato de uranilo acuoso al 0,5%, durante 30 min a 7° C y con citrato de plomo preparado según Reynolds (1963) durante 20 min a 7° C utilizando un sistema automatizado Leica EM AC20. Durante el contraste con el acetato de uranilo y el

citrato de plomo, los cristales de guanina se disuelven y desaparecen lo que conlleva a la observación de las áreas vacías que ocupaban anteriormente (Saenko et al. 2013; Teyssier et al. 2015).

Tabla 1 Características del área de estudio y de las muestras de piel en cinco ejemplares de *R. temporaria*.

Lugar de Muestreo	Localización del Área de Estudio			Muestras				
	Altitud [m s. n. m.]	Localidad	Coordenadas	Rana	SVL [cm]	Id	Re	Área Piel
Área B. Lagos glaciares	2130	Ibón de las ranas en Respomuso	42° 48' 48.8880" N, 0° 16' 54.8280" W	E1	2	E1-1	D	N
				E4	5	E4-1	D	Y
						E4-2	D	N
	2223	Lagos de Anayet	42° 46' 36.0480" N, 0° 26' 34.1700" W	E2	2,5	E2-1	D	Y
	2564	Hoyas de Brazato	42° 44' 37.5060" N, 0° 12' 54.6720" W	E3	3,5	E3-1	D	Y
						E3-2	D	N
						E3-3	V	N
Área A. Fuentes y arroyos	1794	Charcas de Formigal subiendo a Anayet	42° 47' 6.5400" N, 0° 23' 59.6520" W	E5	2,5	E5-1	D	Y
						E5-2	D	N

Nota. Id es la clave de la muestra de piel, Re es la región de piel dorsal (D) o ventral (V). Se diferencian dos tipos de área de piel, área con presencia de manchas melánicas (Y) y con ausencia de manchas melánicas (N).

3.3 Observación mediante Técnicas de Microscopía

Microscopía Óptica (MO)

Las secciones de 0,70 μm de resina Epon teñidas con azul de metileno se examinaron utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 de campo claro y se fotografiaron con una cámara CCD Nikon DS-U2 acoplada al microscopio.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las secciones ultrafinas procesadas se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 a 100 kV equipado con una cámara CCD Orius-Digital Montage Plug-in (Gatan Inc.) utilizando el software Gatan Digital Micrograph (Gatan Inc.).

4. Resultados

4.1 MO

La piel de *R. temporaria* consta de una capa epitelial o epidermis constituida principalmente por queratinocitos y una capa de tejido conectivo o dermis que se localiza bajo la epidermis. Ambas capas están separadas por la membrana basal. Bajo la piel se sitúa el tejido subcutáneo o hipodermis (Figura 5 A, B, I y F, Figura 6 A, D, E y G, Figura 7 A).

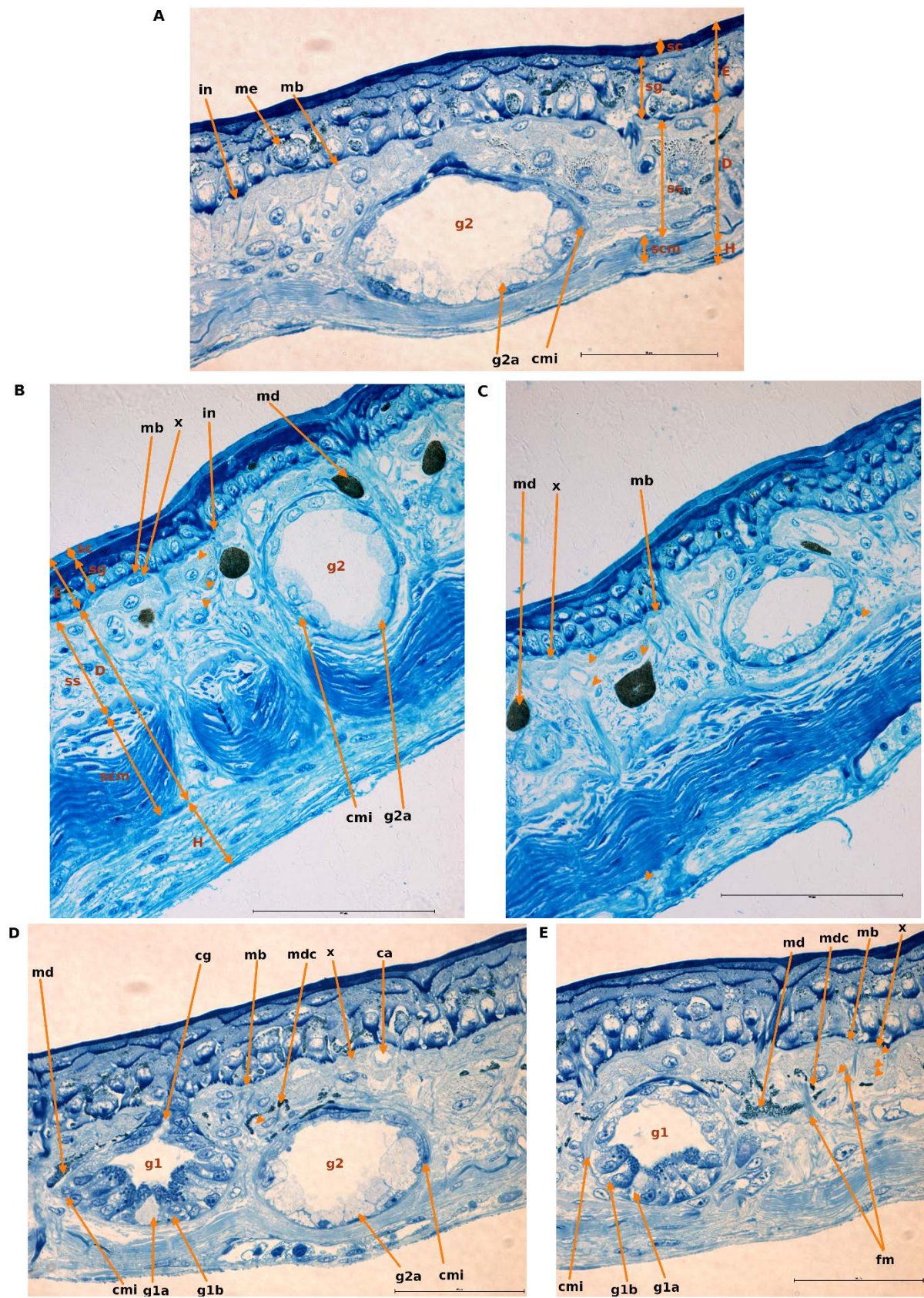
La epidermis de la piel dorsal es un epitelio estratificado plano queratinizado compuesto por cuatro a seis capas de queratinocitos. En contacto con el medio externo se localiza el estrato córneo, formado por una o dos capas de queratinocitos cornificados o parcialmente cornificados sin un núcleo diferenciado. Bajo este estrato, se localiza el estrato germinativo formado por tres o cuatro capas de células poliédricas (Figura 5 A y B, Figura 6 A y D). Las células que forman el estrato basal tienen morfología cilíndrica, el núcleo diferenciado y contactan con la membrana basal mediante interdigitaciones. Estas células basales ascienden en el epitelio y se van aplanando, cambiando de morfología a cúbica y posteriormente a escamosa (Figura 5 A y B, Figura 6 A y B).

En el estrato germinativo se localizan los melanóforos de la epidermis, estos cromatóforos son de morfología dendrítica, citoplasma oscuro y depositan melanina citocrina en los queratinocitos de su alrededor. Los depósitos de melanina se distribuyen por todas las capas celulares de la epidermis debido a la migración de los queratinocitos hacia estratos superiores. En las áreas de piel con manchas melánicas, se observan

queratinocitos con abundantes depósitos de melanina citocrina que oscurecen la epidermis y forman la mancha oscura (Figura 6 A, C, D, E, G y H). En las áreas de piel dorsal sin manchas melánicas, se observan melanóforos de la epidermis pero los depósitos de melanina citocrina son escasos (Figura 5 A, F, e I).

La epidermis de la piel ventral comparte estructura con la piel dorsal, pero tiene un mayor número de capas celulares (entre ocho y diez capas de células). El estrato córneo está constituido por una o dos capas de queratinocitos cornificados o parcialmente cornificados sin núcleo diferenciado. El número de capas celulares del estrato germinativo es mayor en la piel ventral, entre seis y ocho capas, respecto a la piel dorsal, entre tres y cuatro capas. Al igual que en la piel dorsal las células basales presentan interdigitaciones en su zona basal, son de morfología cilíndrica y se aplanan al ascender en el epitelio (Figura 7 A). A diferencia de la piel dorsal, en la piel ventral no se observan melanóforos en la epidermis, ni depósitos de melanina citocrina en los queratinocitos del epitelio (Figura 7 A y B).

En la dermis se diferencian dos capas de tejido conectivo: el estrato esponjoso, más externo y formado por tejido conectivo laxo, y el estrato compacto, localizado entre el estrato esponjoso y la hipodermis y formado por tejido conectivo denso con fibras de colágeno entrecruzadas y paralelas entre sí (Figura 5 A, B, F e I, Figura 6 A, D, F, G, H e I, Figura 7 B).



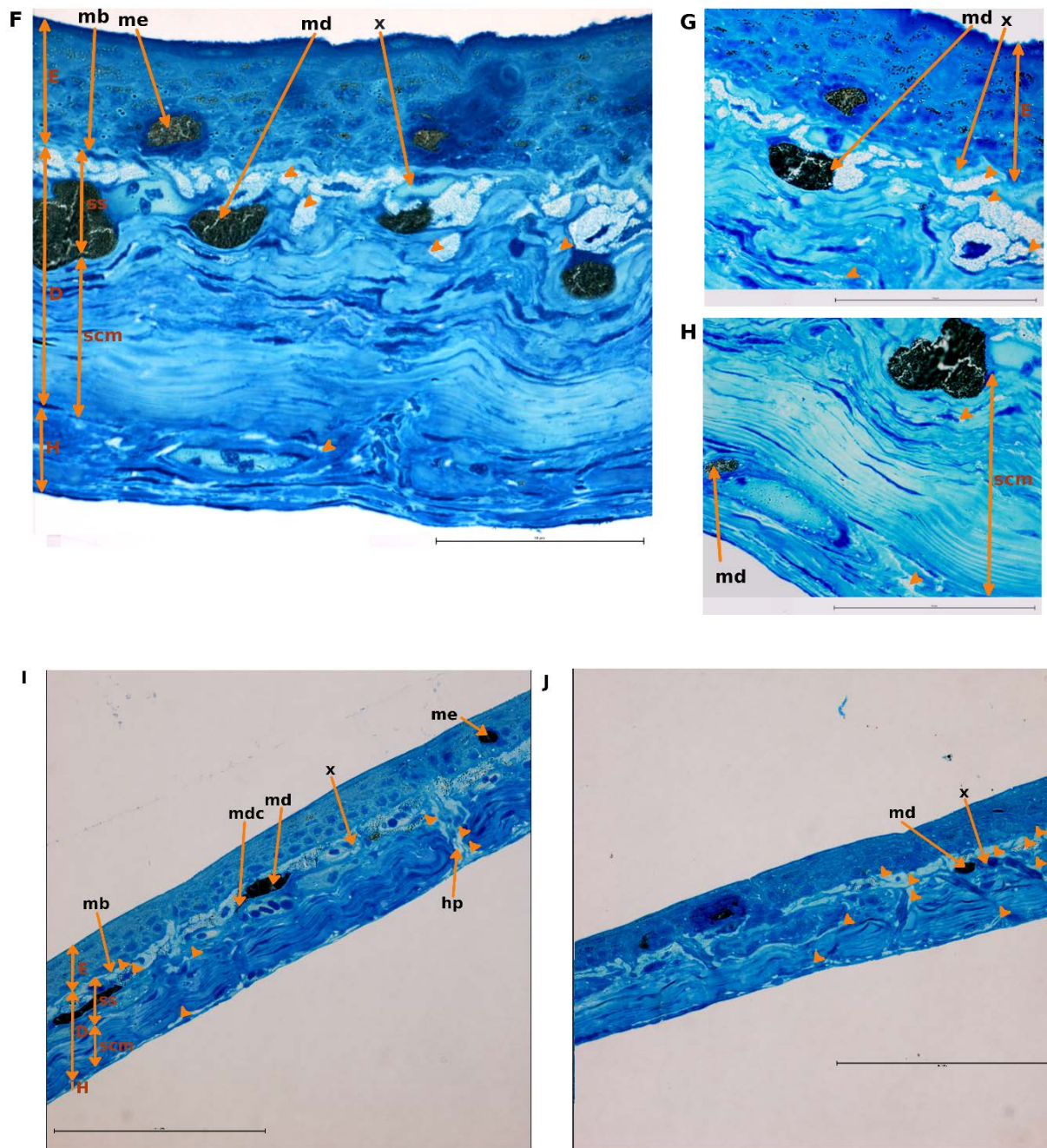
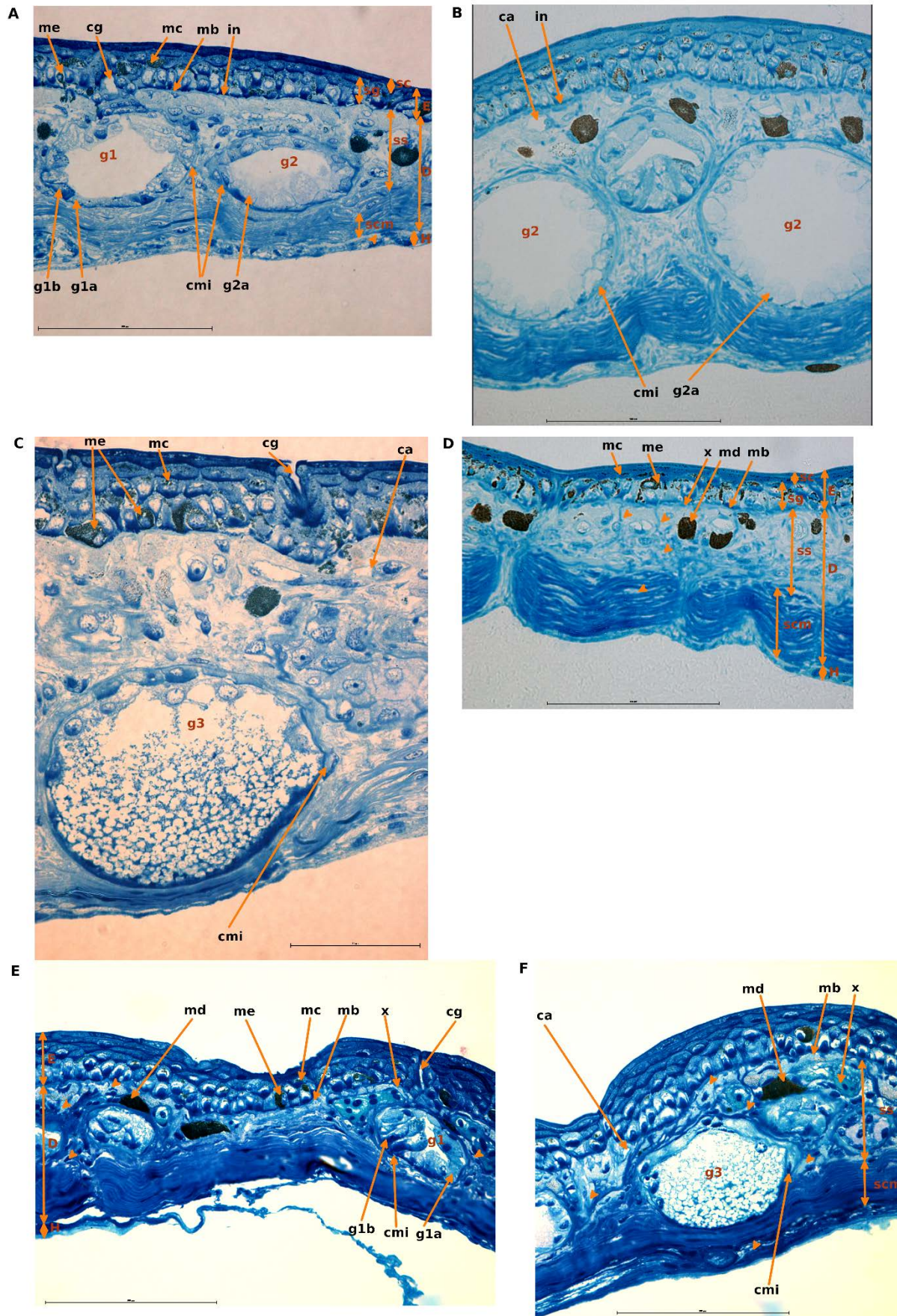


Figura 5 Sección transversal de piel dorsal sin manchas en *R. temporaria*. Los depósitos de melanina citocrina son escasos en la epidermis. A, B y C) Glándulas mucosas caracterizadas por células secretoras de tipo mucoso con el citoplasma vacuolado y el núcleo basal (A, Rana E1, escala = 50 μ m; B y C, Rana E3, escala = 100 μ m). D y E) Glándulas seromucosas con 2 tipos de células secretoras, mucosas con el citoplasma vacuolado, y serosas con gránulos acidófilos en la zona apical. Xantóforos en contacto con la membrana basal, debajo los iridóforos distribuidos en varias capas de células y melanóforos dérmicos con prolongaciones citoplasmáticas que rodean a los otros cromatóforos. Fibras musculares en superposición a los cromatóforos (D y E, Rana E1, escala = 50 μ m). F, G, H, I y J) Iridóforos distribuidos por toda la dermis esponjosa, próximos a la membrana basal bajo los xantóforos, que están aislados, en grupos y/o a mayor profundidad en contacto con el estrato compacto. Iridóforos inmersos entre las fibras de colágeno de la dermis compacta y localizados en haces

perforantes que parten de la hipodermis y atraviesan el estrato compacto (F, G y H, Rana E4, escala = 50 μm ; I e J, Rana E5, escala = 100 μm). Capilares (ca); células mioepiteliales (cmi); epidermis (E); dermis (D); glándula mucosa tipo 1 o seromucosa (g1), célula secretora mucosa tipo 1 (g1a) y célula secretora serosa tipo 1 (g1b); conducto glandular (cg); glándula mucosa tipo 2 o mucosa (g2) y célula secretora mucosa tipo 2 (g2a); fibras musculares (fm); haces perforantes (hp); hipodermis (H); interdigitaciones (in); iridóforos (puntas de flecha); melanóforos dérmicos (md) y prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (mdc); melanóforos epidérmicos (me); membrana basal (mb); estrato compacto (scm); estrato córneo (sc); estrato germinativo (sg); estrato esponjoso (ss); xantóforos (x). Tinción con azul de metileno.

Los cromatóforos de la dermis se localizan generalmente en el estrato esponjoso. En la piel dorsal, se observan los xantóforos localizados en contacto con la membrana basal formando una capa, los iridóforos distinguibles por su citoplasma claro debido a las plaquetas reflectantes y los melanóforos dérmicos con el citoplasma oscuro por la melanina (Figura 5 B, C, D, E, F, G, I y J, Figura 6 D, E, F, G y H). Los xantóforos también se localizan a mayor profundidad en el estrato esponjoso, alrededor de los iridóforos, o en agregados junto a otros xantóforos (Figura 5 F, G, I y J, Figura 6 F, G y H). Los iridóforos se distribuyen en una o varias capas debajo de los xantóforos, localizados junto a la membrana basal, y a diferente profundidad en el estrato esponjoso (Figura 5 B, C, D, E, F, G, H, I y J, Figura 6 D, F, G y H). También se localizan muy próximos a la parte más externa del estrato compacto (Figura 5 C, H, I y J, Figura 6 E, H e I), inmersos entre las fibras de colágeno del estrato compacto (Figura 5 F y J, Figura 6 D, E, F e I) y en la hipodermis en contacto con la zona más interna del estrato compacto (Figura 5 C, F, H, I y J, Figura 6 F, G e I). Los melanóforos de la dermis son menos abundantes que los otros tipos de cromatóforos y se localizan bajo los xantóforos y los iridóforos (Figura 5 B, C, D, E, F, G, I y J, Figura 6 D, E, F, G y H), sus prolongaciones citoplasmáticas están cargadas de melanina y se distribuyen rodeando a estos cromatóforos (Figura 5 D, E e I, Figura 6 G). De forma aislada se localizan melanóforos en la hipodermis junto al estrato compacto (Figura 5 H). En superposición a los cromatóforos se localizan fibras musculares en dirección ascendente hacia la epidermis (Figura 5 E).



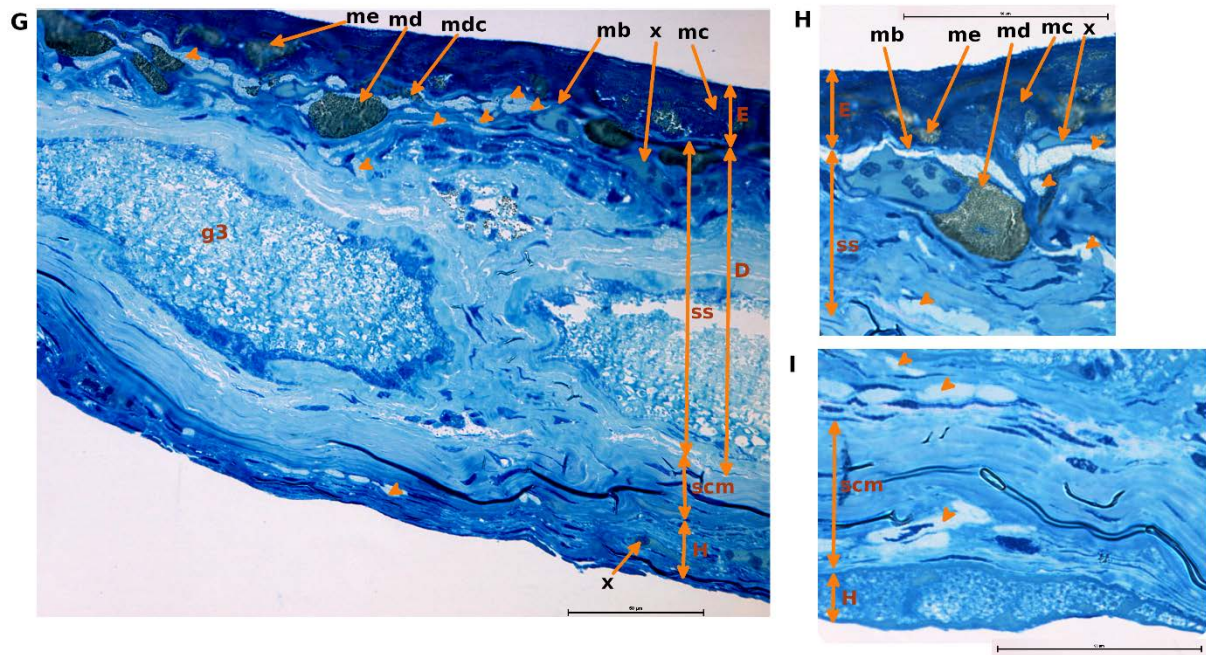


Figura 6 Sección transversal de piel dorsal con manchas en *R. temporaria*. Los melanóforos epidérmicos depositan melanina citocrina en las células adyacentes que oscurece la epidermis. A y B) Estrato córneo compuesto por 1 o 2 capas de células de queratinocitos cornificados y estrato germinativo formado por 3 o 4 capas de células poliédricas. Células basales del estrato germinativo en contacto con la membrana basal mediante interdigitaciones (A, Rana E2, escala = 100 μ m; B, Rana E3, escala = 100 μ m). C, D, E y F) Glándulas serosas muy voluminosas de morfología redondeada. Xantóforos en contacto con la membrana basal y bajo las capas de iridóforos. Melanóforos dérmicos debajo de los xantóforos y en contacto con los iridóforos (C, Rana E2; escala = 50 μ m; D, Rana E3, escala = 100 μ m; E y F, Rana E5, escala = 100 μ m). G, H y I) Glándulas serosas de morfología ovalada. Iridóforos distribuidos en capas a diferente profundidad, próximos a los xantóforos junto a la membrana basal y en contacto con el estrato compacto. Iridóforos embebidos en el estrato compacto. Xantóforos e iridóforos en la hipodermis (G, H e I, Rana E4, escala = 50 μ m). Capilares (ca); células mioepiteliales (cmi); conducto glandular (cg); epidermis (E); dermis (D); glándula mucosa tipo 1 o seromucosa (g1), célula secretora mucosa tipo 1 (g1a) y célula secretora serosa tipo 1 (g1b); glándula mucosa tipo 2 o mucosa (g2) y célula secretora mucosa tipo 2 (g2a); glándula serosa tipo 3 (g3); hipodermis (H); interdigitaciones (in); iridóforos (puntas de flecha); melanóforos dérmicos (md) y prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (mdc); melanóforos de la epidermis (me); melanina citocrina (mc); membrana basal (mb); estrato compacto (scm); estrato córneo (sc); estrato germinativo (sg); estrato esponjoso (ss); xantóforos (x). Tinción con azul de metileno.

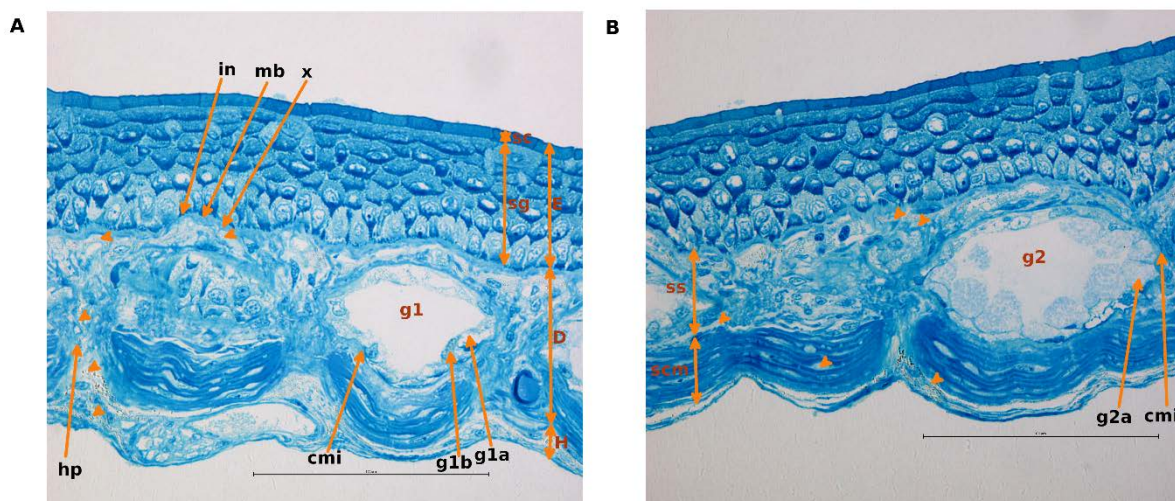


Figura 7 Sección transversal de piel ventral en *R. temporaria*. A y B) Estrato córneo compuesto por 1 a 2 capas de queratinocitos cornificados y estrato germinativo formado por 6 a 8 capas de células poliédricas. Interdigitaciones en las células basales. Glándulas mucosas y seromucosas rodeadas por células mioepiteliales. Xantóforos en contacto con la membrana basal. Iridóforos distribuidos en varias capas de células: bajo los xantóforos y a diferente altitud en dicho estrato. Iridóforos inmersos en el estrato compacto, en los haces perforantes y en la hipodermis (A y B, Rana E3, escala 100 μ m). Células mioepiteliales (cmi); epidermis (E); dermis (D); glándula mucosa tipo 1 o seromucosa (g1), célula secretora mucosa tipo 1 (g1a) y célula secretora serosa tipo 1 (g1b); glándula mucosa tipo 2 o mucosa (g2) y célula secretora mucosa tipo 2 (g2a); haces perforantes (hp); hipodermis (H); interdigitaciones (in); membrana basal (mb); estrato compacto (scm); estrato córneo (sc); estrato germinativo (sg); estrato esponjoso (ss). Tinción con azul de metileno.

En la piel ventral no se observan melanóforos, pero los xantóforos e iridóforos tienen una distribución similar a los cromatóforos de la piel dorsal. Los xantóforos se localizan en contacto con la membrana basal. Los iridóforos se distribuyen en varias capas de células en el estrato esponjoso, bajo los xantóforos y a mayor profundidad alcanzando el estrato compacto. También se encuentran entre las fibras de colágeno de la dermis compacta y en la hipodermis (Figura 7 A y B).

El estrato compacto está atravesado por haces perforantes que parten de la hipodermis y la comunican con el estrato esponjoso, en ellos se localizan iridóforos tanto en la región dorsal (Figura 5 I) como la ventral (Figura 7 A).

En el estrato esponjoso se localizan las glándulas dérmicas, que son pluricelulares, alveolares, exocrinas y pueden ser de naturaleza mucosa o serosa. En la piel dorsal y

ventral se observan dos tipos de glándulas mucosas de tamaño similar: la glándula seromucosa o glándula mucosa tipo 1 y la glándula mucosa o mucosa tipo 2. La glándula mucosa tipo 1 se caracteriza por un epitelio secretor simple con dos tipos de células secretoras localizadas en la zona basal y lateral de la glándula: la célula secretora mucosa tipo 1 con el citoplasma vacuolado y la célula secretora serosa tipo 1 con gránulos acidófilos en la zona apical del citoplasma (Figura 5 D y E, Figura 6 A y E, Figura 7 A). La glándula mucosa tipo 2 está constituida por un único tipo de célula secretora, la célula secretora mucosa tipo 2, estas células tienen el núcleo basal, el citoplasma vacuolado y se localizan en la zona basal y lateral de la glándula (Figura 5 A, B, y D, Figura 6 A y B, Figura 7 B). En el área de la piel dorsal con manchas melánicas se distinguen las glándulas serosas. Estas glándulas son de mayor tamaño que las mucosas y ocupan un gran volumen del estrato esponjoso. Se observan glándulas serosas con forma redondeada (Figura 6 C y F) y con una morfología ovalada (Figura 6 G). Las secreciones glandulares se depositan en el lumen y se liberan al exterior a través de conductos glandulares que atraviesan la epidermis (Figura 5 D, Figura 6 A, C y E). Este proceso está favorecido por las células mioepiteliales que rodean la glándula (Figura 5 A, B, D y E, Figura 6 A, B, C y F, Figura 7 A y B). El estrato esponjoso está invaginado por capilares que parten de la hipodermis y atraviesan la dermis (Figura 5 D, Figura 6 B, C y F).

4.2 MET

Se estudió la ultraestructura de la piel por MET. En contacto con la membrana basal se localiza el estrato germinativo formado por tres o cuatro capas de células (Figura 8). Las células basales del estrato germinativo tienen el núcleo bien diferenciado y están en contacto con la membrana basal mediante extensiones citoplasmáticas que profundizan en la dermis. El núcleo de las células de los estratos superiores está aplanado. Entre las células se visualizan espacios intercelulares (Figura 9 A y C). Las células de este estrato tienen en el citoplasma numerosos tonofilamentos con diferente orientación que generalmente están agrupados en haces o anclados en desmosomas (Figura 9 E).

En contacto con el exterior y sobre el estrato germinativo se localiza el estrato córneo. Este estrato se compone de 1 o 2 capas de queratinocitos cornificados aplanados que carecen de un núcleo diferenciado (Figura 9 A). El estrato córneo es similar en la piel dorsal y ventral, las células son escamosas, están unidas entre ellas mediante uniones intercelulares y tienen el citoplasma lleno de tonofilamentos compactados (Figura 9 D, Figura 10). Estas células están unidas a las del estrato germinativo mediante desmosomas (Figura 9 D). La superficie más externa del estrato córneo tiene protuberancias donde se localiza una capa de moco (Figura 9 D y H, Figura 10).

Los melanóforos de la epidermis se localizan entre las células basales del estrato germinativo muy próximos a la membrana basal (Figura 9 B). Estos melanóforos tienen el citoplasma lleno de melanosomas casi esféricos repletos de melanina y prolongaciones dendríticas que rodean a los queratinocitos de su alrededor (Figura 9 A, B y E). Los melanóforos epidérmicos depositan melanina citocrina en las células colindantes (Figura 9 A y D). Aunque los melanóforos de la epidermis únicamente se localizan en el estrato germinativo, los depósitos de melanina citocrina se observan también en las células superficiales del epitelio (Figura 9 A y D). En las áreas con manchas melánicas, los melanóforos de la epidermis depositan melanina citocrina en los queratinocitos vecinos (Figura 9 A), mientras que en las áreas sin manchas los depósitos de melanina citocrina son escasos (Figura 9 H). En las ranas de mayor tamaño, se observan gránulos de moco en todas las capas celulares del epitelio tanto en la piel dorsal como ventral (Figura 9 G, y H, Figura 10).

La membrana basal está compuesta por la lámina basal y la lámina reticular. La lámina basal es el borde superior formado por la lámina lúcida y la lámina densa. Debajo de la lámina basal se localiza la lámina reticular formada por fibras reticulares y de colágeno (Figura 9 F).

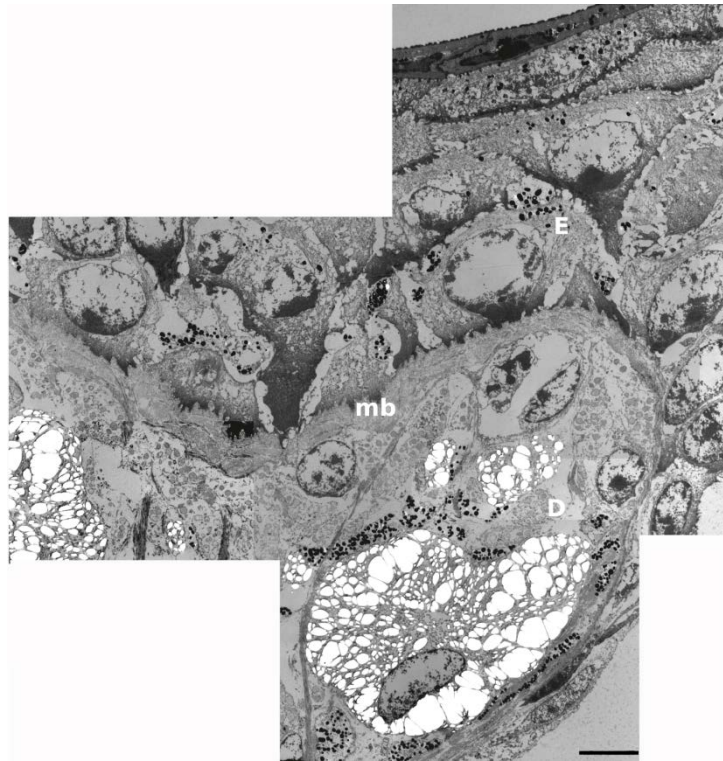
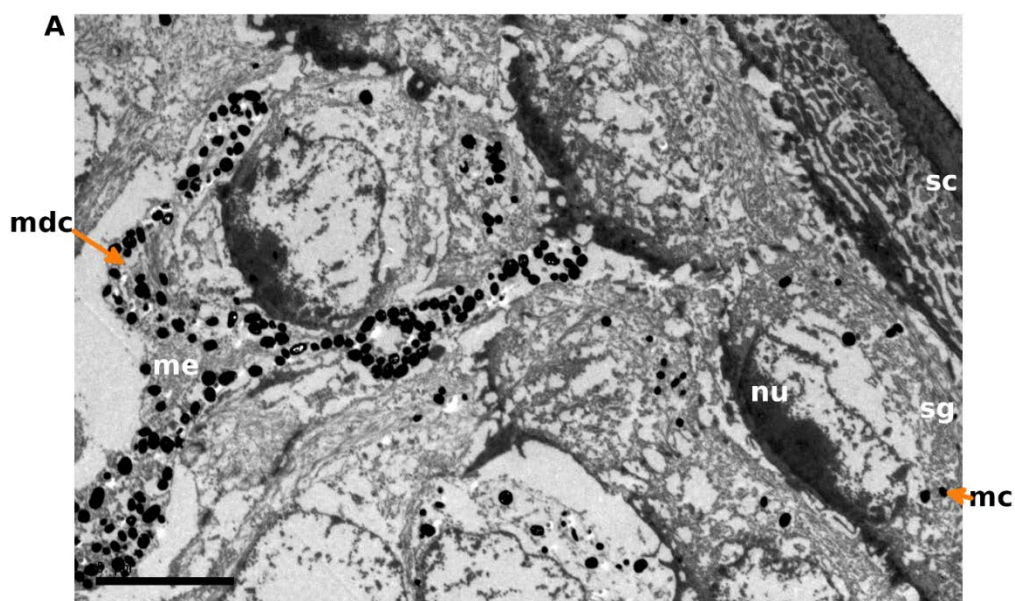
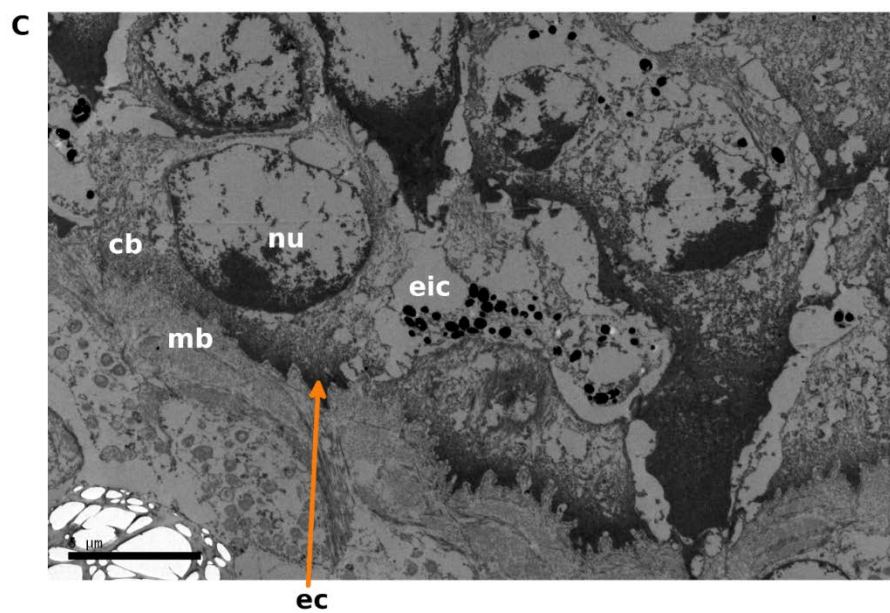
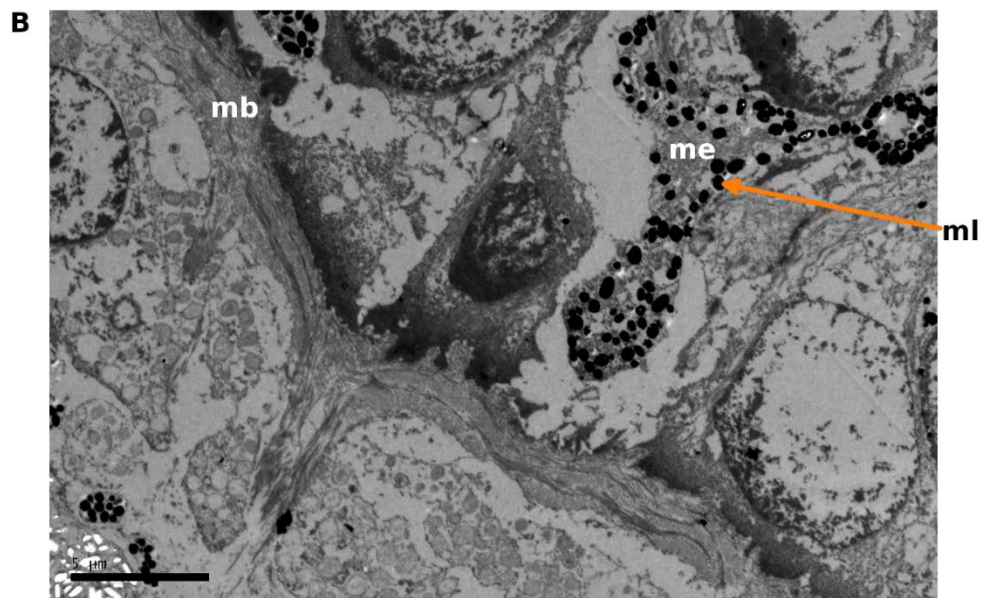
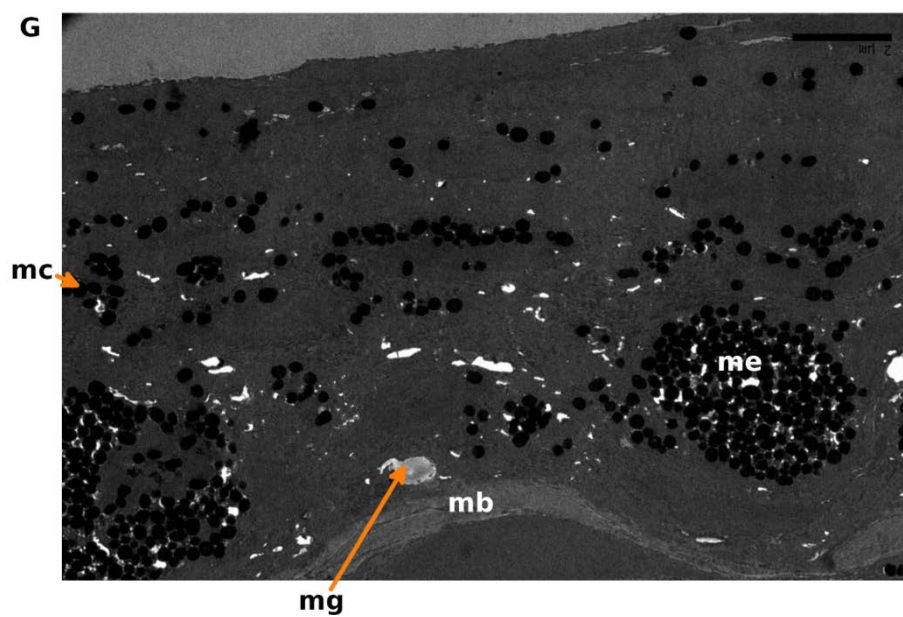
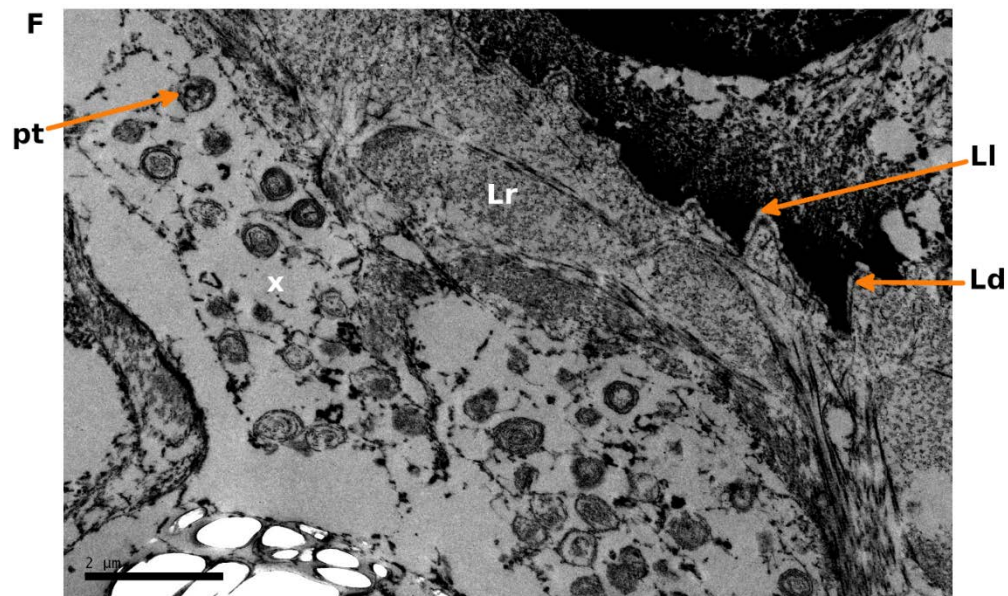
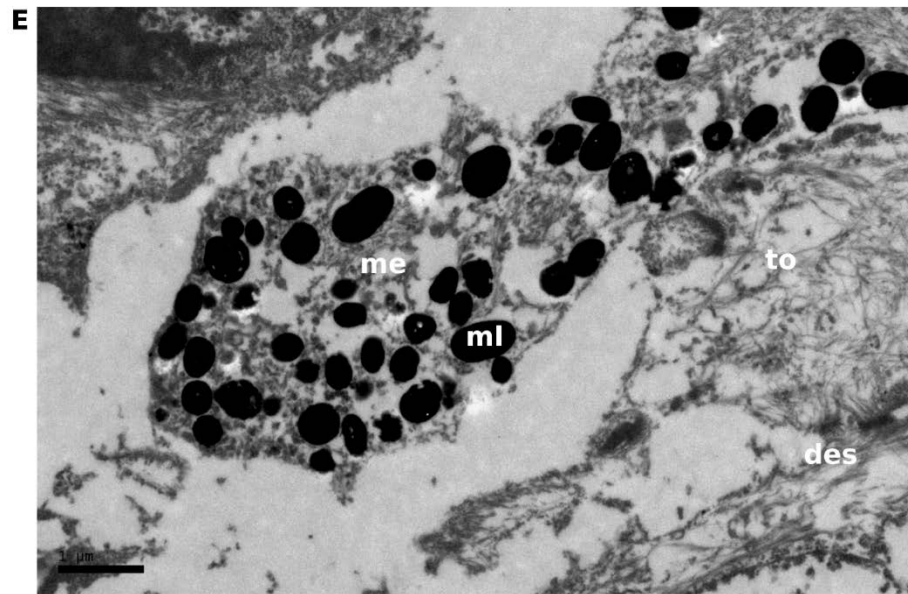


Figura 8 *Epidermis y dermis de una sección transversal de piel dorsal de área con manchas melánicas de R. temporaria.* La lámina es una composición realizada con varias micrografías electrónicas de transmisión. Ultraestructura de la epidermis, la membrana basal y el estrato esponjoso de la dermis (Rana E5, escala = 5 μ m). Epidermis (E); dermis (D); membrana basal (mb).







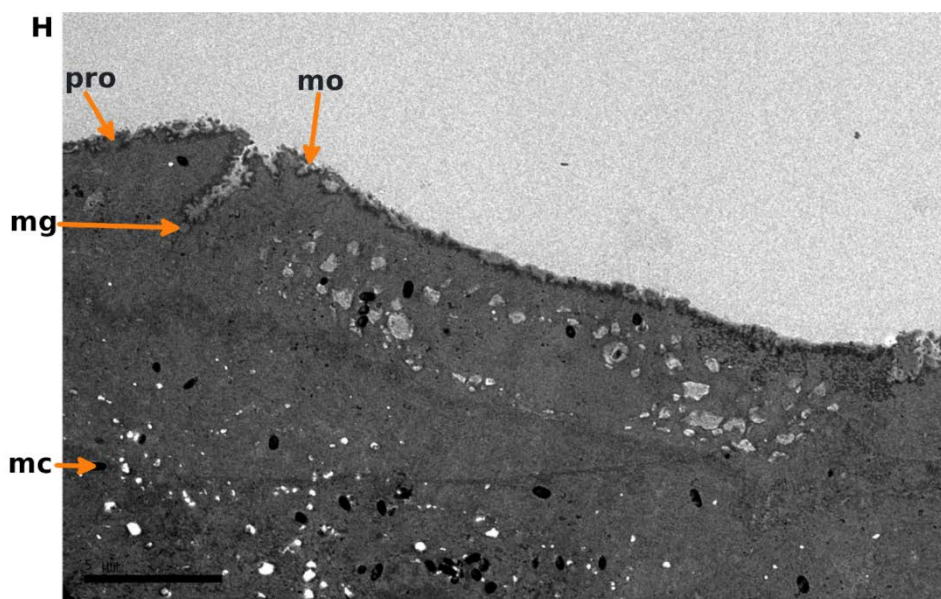


Figura 9 *Epidermis en sección transversal de piel dorsal en R. temporaria.* A) Estrato córneo con dos capas de queratinocitos aplanados. Melanóforo con prolongaciones dendríticas y queratinocitos con depósitos de melanina citocrina en el estrato germinativo (Rana E5, escala = 5 µm). B) Melanóforo localizado próximo a la membrana basal con melanosomas en el citoplasma (Rana E5, escala = 5 µm). C) Células basales del estrato germinativo con núcleo grande y extensiones citoplasmáticas que penetran en la dermis. Espacios intercelulares entre las células (Rana E5, escala = 5 µm). D) Células del estrato córneo escamosas, con el citoplasma lleno de tonofilamentos y unidas entre sí mediante uniones intercelulares. La superficie externa presenta protuberancias y una capa de moco. Estrato córneo unido al estrato germinativo mediante desmosomas (Rana E5, escala = 1 µm). E) Melanóforo con el citoplasma lleno de melanosomas. Células del estrato germinativo con tonofilamentos en su citoplasma y desmosomas (Rana E5, escala = 1 µm). F) Membrana basal formada por la lámina basal y la lámina reticulada. La lámina basal está compuesta por la lámina lúcida y la lámina densa. En contacto, xantóforos con pterinosomas en su citoplasma (Rana E5, escala = 2 µm). G) Área con mancha melánica. Los melanóforos de la epidermis depositan melanina citocrina en los queratinocitos vecinos. Los queratinocitos tienen gránulos mucosos en su citoplasma (Rana E4, escala = 2 µm). H) Área sin mancha melánica. Los depósitos de melanina citocrina son escasos. Capa de moco sobre la superficie externa de la epidermis (Rana E4, escala = 5 µm). Células basales (cb); desmosomas (des); extensiones citoplasmáticas (ec); espacios intercelulares (eic); lámina lúcida (LI); lámina densa (Ld); lámina reticular (Lr); melanina citocrina (mc); melanóforos de la epidermis (me); melanosomas (ml); membrana basal (mb); prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (mdc); gránulo mucoso (mg); moco (mo); núcleo (nu); protuberancias (pro); pterinosomas (pt); estrato córneo (sc); estrato germinativo (sg); tonofilamentos (to); uniones intercelulares (ui); xantóforo (x).

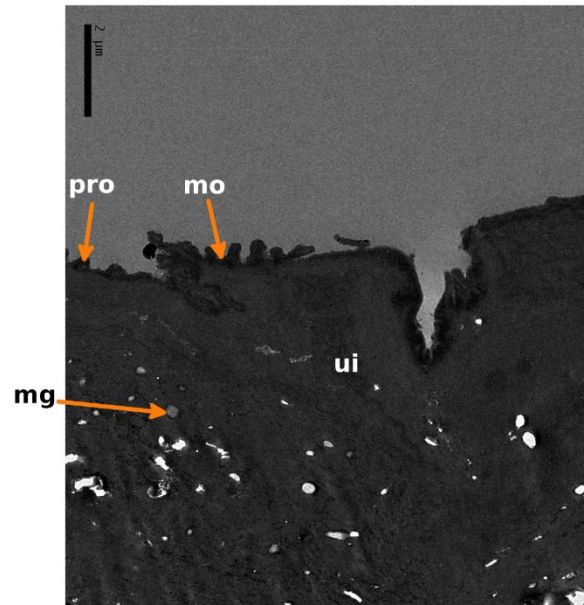


Figura 10 *Epidermis en sección transversal de piel ventral en R. temporaria.* Estrato córneo con células queratinizadas, se observan las uniones intercelulares y gránulos mucosos en el citoplasma. La superficie externa presenta protuberancias y una capa de moco (Rana E3, escala = 2 μ m). Gránulo mucoso (mg); moco (mo); protuberancias (pro); uniones intercelulares (ui).

En la dermis se observan tres tipos de cromatóforos, cada uno de ellos caracterizados por sus orgánulos pigmentarios: los xantóforos, los iridóforos, y los melanóforos dérmicos (Figura 11 A, B, C y D).

Los xantóforos son de forma irregular y se caracterizan por la presencia de pterinosomas en su citoplasma. Los pterinosomas son orgánulos pigmentarios con lamelas concéntricas electrodensas (Figura 9 F, Figura 11 A, B, C y G). En el estrato esponjoso los xantóforos se localizan bajo la membrana basal formando una capa (Figura 9 F, Figura 11 A y B), a mayor profundidad alrededor de los iridóforos (Figura 11 A, B y C), y cercanos a la dermis compacta alrededor de las glándulas dérmicas. En el estrato compacto se observan xantóforos entre las fibras de colágeno (Figura 11 G).

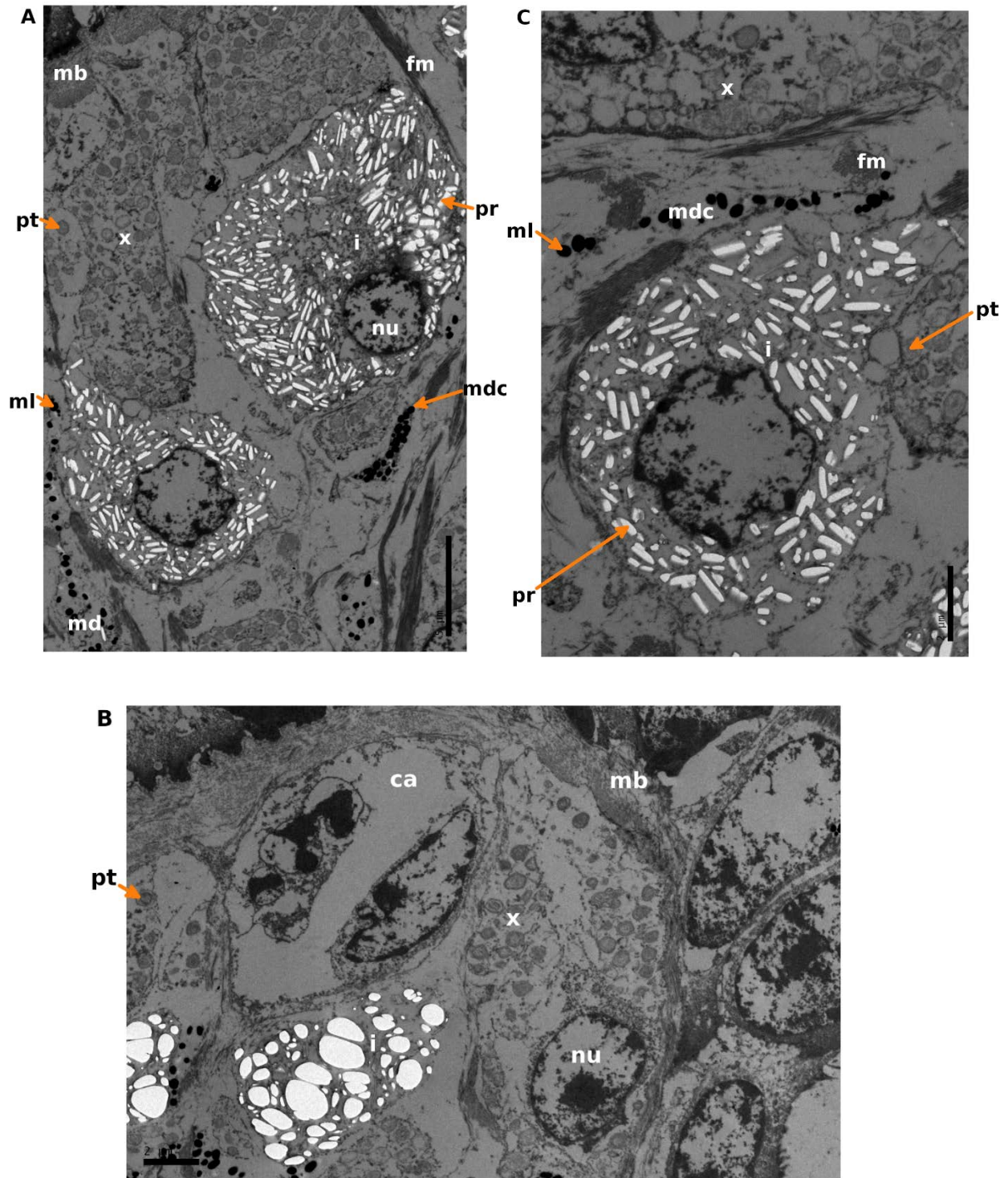
Los iridóforos son de morfología redondeada y se caracterizan por la presencia de plaquetas reflectantes en su citoplasma (Figura 11 A y C, Figura 12). Los cristales de guanina que constituyen las plaquetas reflectantes, se disuelven durante el procesamiento del tejido para su observación por técnicas de microscopía, por lo que generalmente se

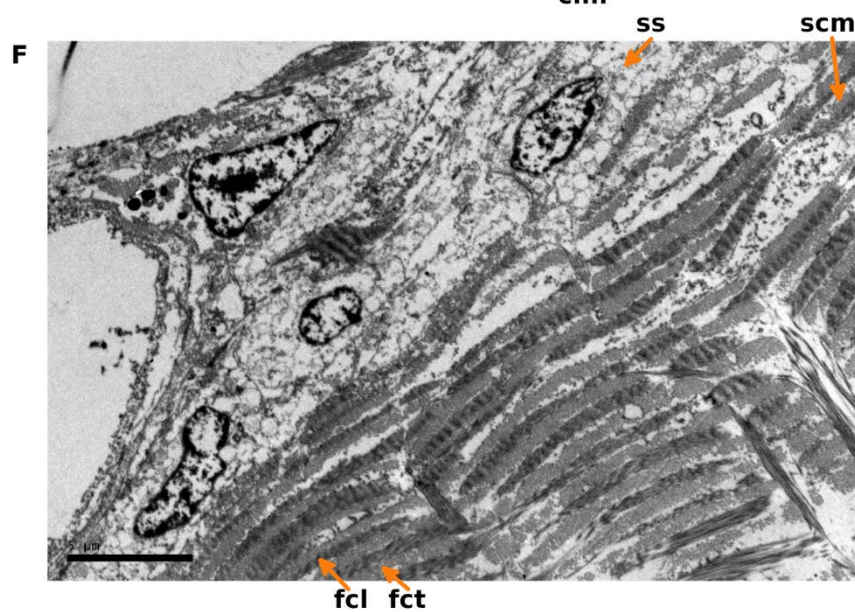
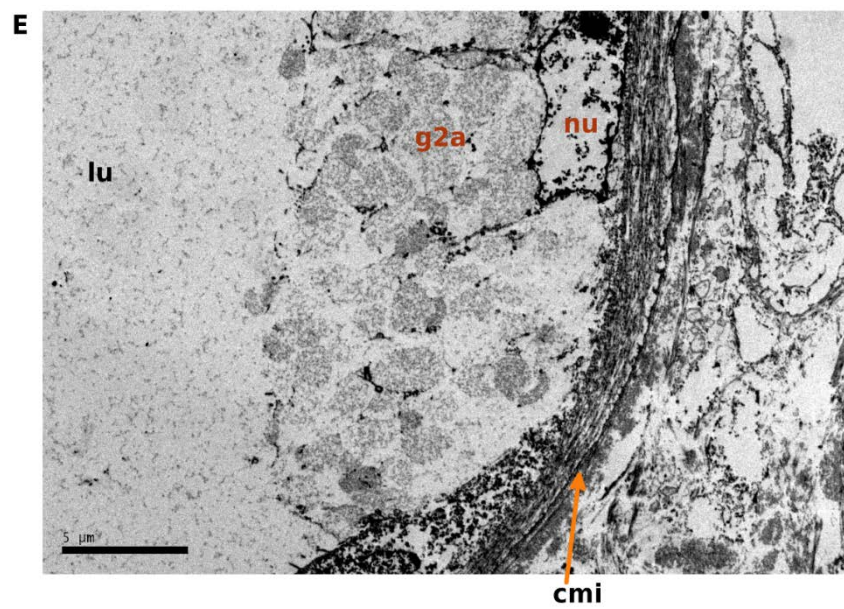
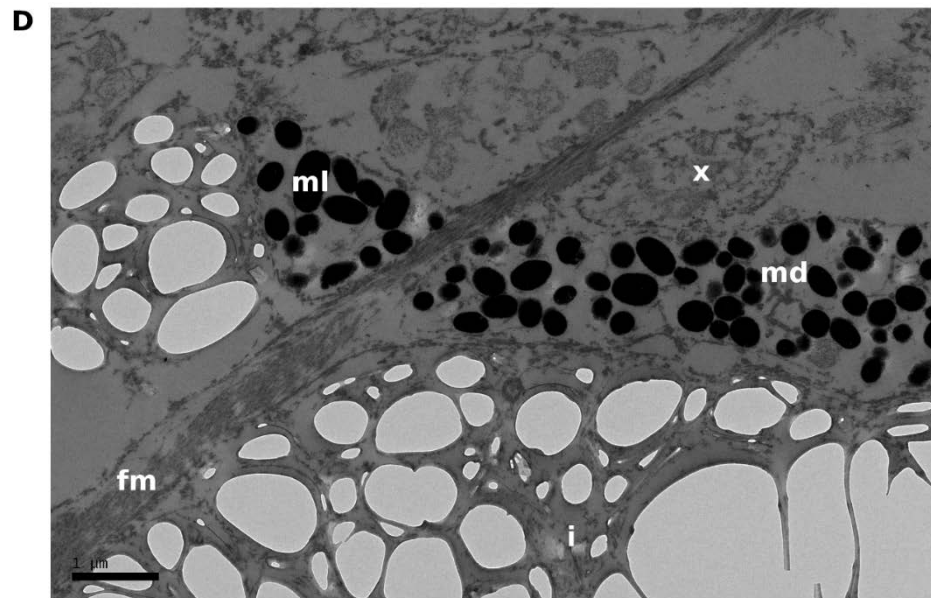
observa el espacio vacío blanco que ocupaba el cristal. Las plaquetas reflectantes son de distinto tamaño, de morfología cuadrangular y forman diferentes ángulos respecto a la superficie epidérmica: se observan plaquetas reflectantes paralelas, oblicuas y perpendiculares (Figura 11 A y C). Los iridóforos se distribuyen por todo el estrato esponjoso, se observan junto a los xantóforos muy próximos a la membrana basal (Figura 11 A y C) o cercanos a la dermis compacta, rodeando a las glándulas dérmicas tanto en su zona lateral como basal. En el estrato esponjoso los iridóforos se localizan entre las fibras de colágeno. Con frecuencia esta zona del tejido cuando presenta iridóforos se rompe, siendo difícil su observación por MET. Se observan los iridóforos con sus plaquetas reflectantes entre las fibras de colágeno en una micrografía de piel ventral (Figura 12).

Los melanóforos dérmicos se caracterizan por un citoplasma lleno de melanosomas casi esféricos de color negro. Se localizan bajo los iridóforos y xantóforos extendiendo sus prolongaciones citoplasmáticas alrededor de estos cromatóforos (Figura 11 A, C y D). De forma aislada se observan melanóforos localizados entre las fibras de colágeno del estrato compacto (Figura 11 H).

En el estrato esponjoso se localizan fibras musculares en dirección ascendente hacia la epidermis y transversales que rodean a los iridóforos, xantóforos y melanóforos (Figura 11 A y C). Estas fibras también se observan en superposición a los xantóforos y melanóforos (Figura 11 D). En la dermis esponjosa se localizan las glándulas dérmicas. Se observa una glándula mucosa rodeada por células mioepiteliales. Las células secretoras mucosas tienen gránulos mucosos en el citoplasma que liberan al lumen de la glándula y el núcleo aplanado y basal (Figura 11 E).

En la dermis compacta se visualizan las fibras de colágeno entrecruzadas apreciándose las fibras seccionadas transversalmente y longitudinalmente tanto en la piel dorsal (Figura 11 F) como en la ventral (Figura 12).





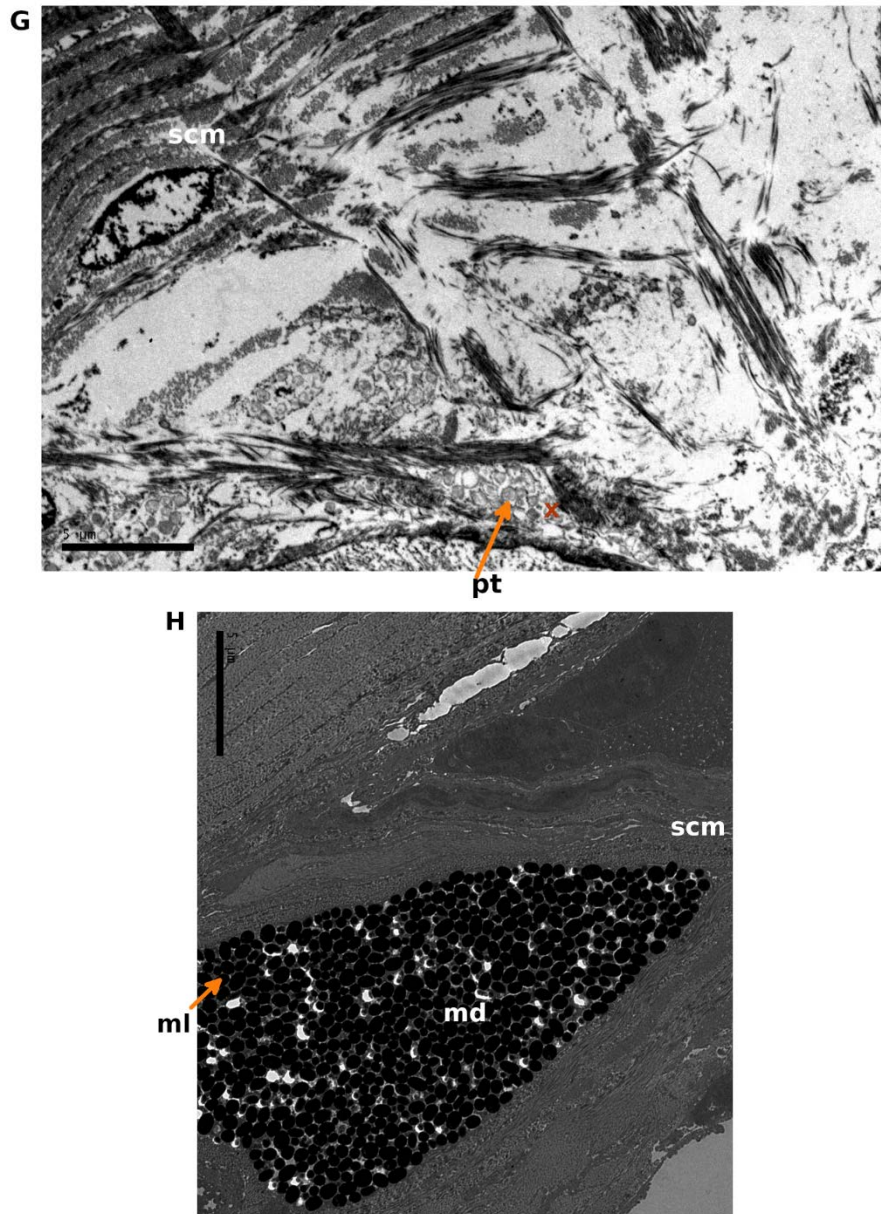


Figura 11 Sección transversal de la dermis de piel dorsal con mancha melánica en *R. temporaria*. A) Los xantóforos se localizan junto a la membrana basal formando una capa y debajo de los iridóforos. Bajo los xantóforos se localizan los iridóforos. Los melanóforos de la dermis tienen prolongaciones citoplasmáticas que rodean a xantóforos e iridóforos (Rana E4, escala = 5 μ m). B) Xantóforos en contacto con la membrana basal. Los pterinosomas del citoplasma se caracterizan por la presencia de lamelas concéntricas electrodensas (Rana E4, escala = 2 μ m). C) Iridóforos con plaquetas reflectantes en el citoplasma (Rana E4, escala = 1 μ m). D) Fibras musculares sobre los cromatóforos y alrededor de estos (Rana E4, escala = 1 μ m). E) Células mioepiteliales rodeando la glándula mucosa. Células secretoras mucosas, el núcleo es aplanado y basal, el citoplasma contiene gránulos mucosos (Rana E4, escala = 5 μ m). F y G) Límite del estrato esponjoso con el estrato compacto. Xantóforo localizado en el estrato compacto. Las fibras de colágeno están entrecruzadas, se visualizan en sección longitudinal y transversal (Rana E4, escala = 5 μ m). H) Melanóforo localizado en el estrato compacto (Rana E4,

escala = 5 μm). Capilar (ca); fibras de colágeno en sección longitudinal (fcl) y en sección transversal (fct); glándula mucosa tipo 2 o mucosa (g2) y célula secretora mucosa tipo 2 (g2a); iridóforo (i); lumen glandular (lu); membrana basal (mb); melanóforo dérmico (md) y prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (mdc); melanosoma (ml); núcleo (nu); plaqueta reflectante (pr); pterinosoma (pt); estrato compacto (scm); estrato esponjoso (ss); xantóforo (x).

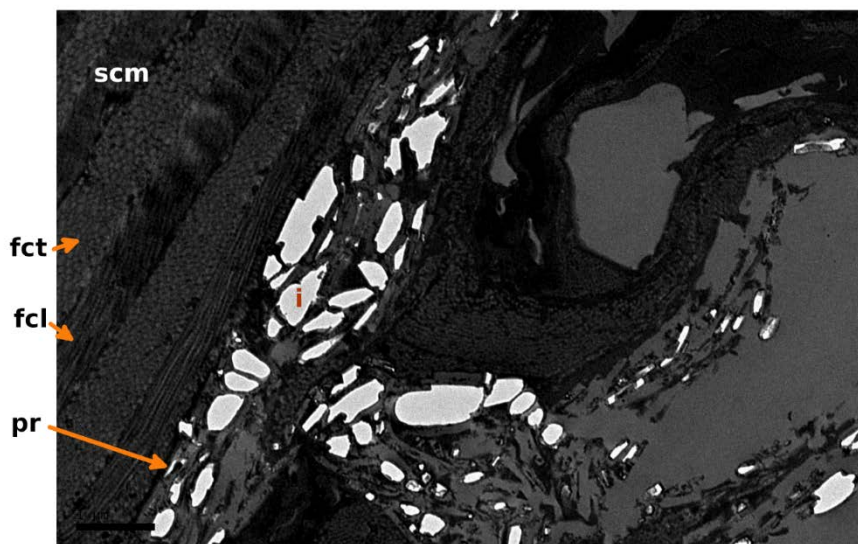


Figura 12 Sección transversal de la dermis de la piel ventral en *R. temporaria*. Fibras de colágeno entrecruzadas de la dermis compacta, se distinguen las fibras seccionadas transversal y longitudinalmente. Iridóforos con plaquetas reflectantes localizados entre las fibras de colágeno (Rana E3, escala = 1 μm). Fibras de colágeno en sección longitudinal (fcl) y en sección transversal (fct); iridóforo (i); plaquetas reflectantes (pr); estrato compacto (scm).

5. Discusión

En este capítulo se describen las características morfológicas de la piel dorsal y ventral de la *R. temporaria* alpina utilizando técnicas histológicas, y se estudian las estructuras responsables de la formación del patrón dorsal de manchas oscuras y del color de la piel.

La piel de la *R. temporaria* consiste en una capa epitelial externa o epidermis, una capa interna de tejido conectivo o dermis, y una membrana basal que separa ambas capas. Esta estructura es similar a la descrita en numerosas especies de anuros (Andrew, 1959; Voûte, 1963; Farquhar y Palade, 1964; Blaylock et al., 1976; Toledo y Jared, 1993; Duellman y Trueb, 1994; Greven et al., 1995; Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998; Azevedo et al., 2005, 2007; Felsemburgh et al., 2007, 2009).

La epidermis es un epitelio estratificado plano queratinizado compuesto por cuatro a seis capas de células en la piel dorsal y por ocho a diez capas en la piel ventral. En otras especies de anuros, la piel dorsal consta de tres a cinco capas como se ha observado en *O. americanus* y *P. boiei* (Felsemburgh et al., 2007), de seis a ocho capas en *H. arborea* (Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998) y en *L. pipiens* (Parakkal y Matoltsy, 1964), y de cinco a ocho capas de células en la piel ventral de *L. pipiens*, *L. catesbeiana* y *R. marina* según Farquhar y Palade (1964), en *P. sauvagii* (Blaylock et al., 1976) y en *H. arborea* (Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998). El estrato germinativo está formado por varias capas de células localizadas entre el estrato córneo y la membrana basal. La epidermis de anfibios y mamíferos difieren estructural y fisiológicamente, ya que las células germinativas de ambos grupos son similares, pero a diferencia de los mamíferos, la epidermis de rana no contiene gránulos de queratohialina ni capa granular, y el estrato córneo tiene una o dos capas de grosor (Andrew, 1959; Parakkal y Matoltsy, 1964). Otros autores consideran que el estrato germinativo se reduce a la capa de células columnares que descansa sobre la membrana basal y describen un estrato intermedio formado por capas de células poliédricas que se localizan entre el estrato germinativo y el córneo (Farquhar y Palade, 1964; Toledo y Jared, 1993; Felsemburgh et al., 2007). En la piel de la *R. temporaria*, las células en contacto con la membrana basal, tienen extensiones citoplasmáticas que penetran en la dermis como se describe en *L. pipiens* (Voûte, 1963; Parakkal y Matoltsy, 1964). Estas células basales, de morfología cilíndrica y núcleo diferenciado, conforme ascienden en el epitelio se aplanan y cambian a una morfología escamosa, este cambio morfológico se ha descrito en *L. pipiens*

(Voûte, 1963), *P. rohdei* (Toledo y Jared, 1993), *H. arborea* (Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998), *O. americanus* y *P. boiei* (Felsemburgh et al., 2007). Durante el proceso de queratinización y diferenciación celular, los queratinocitos se compactan, el núcleo se aplana hasta que es indistinguible y los tonofilamentos del citoplasma se vuelven más densos y numerosos, presentando las células del estrato córneo el citoplasma completa o casi completamente queratinizado al igual que se describe en anuros en general (Le Quang Trong y Bouligand, 1976; Duellman y Trueb, 1994) como en *L. pipiens* (Voûte, 1963; Farquhar y Palade, 1964; Parakkal y Matoltsy, 1964), en *L. catesbeiana* y *R. marina* (Farquhar y Palade, 1964), y en *P. sauvagii* según Blaylock et al. (1976). Los queratinocitos del estrato germinativo están unidos entre ellos y también unidos a los queratinocitos del estrato córneo mediante desmosomas, tal y como se describe en *L. pipiens* (Voûte, 1963; Farquhar y Palade, 1964; Parakkal y Matoltsy, 1964) y en *L. catesbeiana* y *R. marina* (Farquhar y Palade, 1964). Entre los queratinocitos del estrato córneo, se localizan uniones intercelulares como se describe en *P. sauvagii* según Blaylock et al. (1976).

La superficie más externa de la epidermis está cubierta por una capa de moco, como se observó en *L. pipiens*, *L. catesbeiana* y *R. marina* (Farquhar y Palade, 1964) y en *P. sauvagii* (Blaylock et al., 1976), la cual es importante para el mantenimiento del balance hídrico y la termorregulación (Blaylock et al., 1976; Toledo y Jared, 1993).

La dermis tiene la misma estructura que la observada en otros anuros, el estrato esponjoso se localiza en contacto con la membrana basal y bajo éste el estrato compacto, al igual que se describe en *L. pipiens* (Voûte, 1963), en *P. rohdei* (Toledo y Jared, 1993), en *X. laevis*, (Greven et al., 1995), en *H. arborea* (Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998), en *R. ictérica* (Azevedo et al., 2005), en *O. americanus*, *P. boiei* y *R. ornata* (Felsemburgh et al., 2007, 2009). En el estrato esponjoso se observan capilares, como se observa en *H. arborea* (Andrew, 1959, Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998) y fibras musculares, al igual que describen Elkan, (1968), Duellman y Trueb (1994) y Greven et al. (1995). Se diferencian tres

tipos de glándulas dérmicas de distinto tamaño y características morfológicas, las glándulas seromucosas, mucosas y serosas. Las glándulas seromucosas se corresponden con las glándulas seromucosas descritas en *L. pipiens*, *R. temporaria* y *L. catesbeianus* (Mills y Prum, 1984) y en *P. bicolor* (Moreno-Gómez et al., 2014), con las glándulas mucosas de mayor tamaño de *A. fuscigula* (Els y Henneberg, 1990) y con las glándulas mixtas de *R. ornata* (Felsemburgh et al., 2007, 2009). Las glándulas mucosas observadas en *R. temporaria* se corresponden con las glándulas mucosas descritas en *L. pipiens*, *R. temporaria* y *L. catesbeiana* (Mills y Prum, 1984) y en *P. bicolor* (Moreno-Gómez et al., 2014), y con las glándulas mucosas de pequeño tamaño descritas en *A. fuscigula* (Els y Henneberg, 1990). Las glándulas serosas observadas son similares a las descritas en *L. pipiens*, *R. temporaria*, *L. catesbeianus* según Mills y Prum (1984) y en *R. ornata* según Felsemburgh et al. (2007, 2009). Al igual que en las descripciones de anuros según Mills y Prum (1984), Felsemburgh et al. (2009) y Moreno-Gómez et al. (2014), la porción secretora de las glándulas está rodeada por una capa incompleta de células mioepiteliales. Moreno-Gómez et al. (2014) puntualizan que las glándulas serosas están rodeadas por células de músculo liso fácilmente confundibles con las células mioepiteliales que rodean las glándulas mucosas y seromucosas, pudiendo producirse errores en la terminología.

El estrato compacto está formado por fibras de colágeno entrecruzadas y paralelas entre sí, al igual que describen en anuros (Duellman y Trueb, 1994), en *X. laevis* (Greven et al., 1995) y en *H. arborea* (Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998).

Los melanóforos tienen morfología dendrítica y el citoplasma lleno de melanosomas. La presencia de manchas melánicas está relacionada con la presencia de depósitos de melanina citocrina, se observa que los melanóforos de la epidermis depositan melanina citocrina en los queratinocitos de su alrededor que constituyen las manchas melánicas oscuras, mientras que las áreas de piel donde no se observan manchas melánicas carecen de depósitos de melanina citocrina, tal y como se describe en *L. pipiens* (Hadley y Quevedo, 1966; Bagnara y Matsumoto, 2006) y en *X. laevis* (Zuasti et al., 1998). La piel ventral no está

pigmentada y los melanóforos son escasos en la dermis y en la epidermis, en concordancia con las observaciones realizadas en *H. arborea* (Goniakowska-Witalinska y Kubiczek, 1998) y en *X. laevis* (Zuasti et al., 1998). Así pues, se deduce que las estructuras responsables de la formación del patrón dorsal de manchas oscuras de *R. temporaria* son los melanóforos de la epidermis.

Los melanóforos que se localizan en el estrato esponjoso de la dermis tienen prolongaciones citoplasmáticas dendríticas cargadas de melanosomas que rodean y se superponen a los xantóforos e iridóforos, al igual que se observa en *H. arenicolor*, *H. cinerea*, *A. dacnicolor* y *L. pipiens* (Bagnara et al., 1968) y en *B. orientalis* (Frost y Robinson, 1984). Los xantóforos contienen pterinosomas dispersos por todo el citoplasma, que se caracterizan por la presencia de lamelas concéntricas electrodensas, como se observa en *Xiphophorus helleri* según Matsumoto (1965), *R. japonica* según Yasutomi y Hama (1971, 1976) y en *L. pipiens* según Bagnara (1976). Los iridóforos tienen en su citoplasma plaquetas reflectantes, que generalmente son de morfología rectangular, similares a los que describen Bagnara (1966; 1976), Taylor (1969) y Bagnara y Matsumoto (2006). Estas plaquetas se observan paralelas, transversales o perpendiculares a la epidermis y están organizadas en grupos dentro del iridóforo, no siendo únicamente paralelas a la superficie epidérmica como se describe en *B. orientalis* (Frost y Robinson, 1984). Se observa que la mayoría de las plaquetas reflectantes han perdido el cristal durante el procesamiento del tejido, tal y como observan (Saenko et al. 2013; Teyssier et al. 2015). Estas observaciones muestran que la ultraestructura de los cromatóforos dérmicos en *R. temporaria*, xantóforos, iridóforos y melanóforos, responsables del color de la piel no difiere de la observada en otros anuros.

En la *R. temporaria* se observan iridóforos embebidos en la matriz de colágeno del estrato esponjoso de la dermis, al igual que se observa en *B. orientalis* (Frost y Robinson, 1984), quienes sugieren que estos iridóforos no participan en el patrón de color observado.

Los iridóforos también se localizan en la hipodermis en íntimo contacto con el estrato compacto y en los haces perforantes que atraviesan este estrato, otros autores observaron en anuros iridóforos localizados en la hipodermis de *H. viridiflavus* (Kobelt y Linsenmair, 1986) y en los haces perforantes, sugiriendo que los cromatóforos pueden migrar entre el tejido subcutáneo y el estrato esponjoso de la dermis a través de los haces perforantes (Denefle et al., 1993; Greven et al., 1995).

Los xantóforos se distribuyen por todo el estrato esponjoso, en contacto con la membrana basal y alrededor de los iridóforos en zonas más profundas de este estrato, esta distribución es diferente a la observada en *H. arenicolor*, *H. cinerea*, *A. dacnicolor* y *L. pipiens* según Bagnara et al. (1968) dónde los xantóforos únicamente se localizan bajo la membrana basal formando una capa sobre los iridóforos. Los iridóforos son muy abundantes y se distribuyen en varias capas de células en el estrato esponjoso, a diferencia de las observaciones de Bagnara et al. (1968), quienes observan una única capa de iridóforos. Por lo tanto, los cromatóforos dérmicos de la *R. temporaria* tienen una distribución y ordenación en el espacio diferente a la unidad dérmica del cromatóforo observada en *H. arenicolor*, *H. cinerea* y *A. dacnicolor* (Bagnara et al., 1968), en *L. pipiens* (Bagnara, 1976), *B. orientalis* (Frost y Robinson, 1984) y en *R. japonica* (Sumida et al., 2016).

Al igual que en *R. temporaria*, otros autores describen en *H. viridiflavus*, una rana que modifica la organización espacial de sus cromatóforos dérmicos para adaptarse a la estación seca de la sabana africana, una distribución espacial de los cromatóforos de la dermis diferente a la unidad dérmica del cromatóforo sin que los cromatóforos alteren su ultraestructura (Kobelt y Linsenmair, 1986). En ambos anuros, los iridóforos dérmicos tienen una distribución similar en varias capas de células bajo la capa de xantóforos. Kobelt y Linsenmair (1986) consideran que la distribución de los iridóforos es un mecanismo para incrementar la reflectancia de la radiación UV.

6. Conclusiones

El objetivo de este trabajo se ha cumplido, pues se caracteriza la morfología general de la piel de la *R. temporaria* en poblaciones alpinas y se identifican y describen las estructuras responsables de la formación del patrón dorsal de manchas oscuras y del color de la piel.

Se confirma que los melanóforos epidérmicos de la *R. temporaria* depositan melanina citocrina que constituye las manchas melánicas del patrón dorsal y que los cromatóforos dérmicos son los responsables de proporcionar la coloración a la piel. Los cromatóforos tienen la misma ultraestructura que la observada generalmente en anuros, sin embargo difieren en su ordenamiento espacial. La organización espacial de los iridóforos en la dermis es similar a la descrita en el tegumento de una rana que habita en la sabana africana. Estos resultados sugieren que la distribución de los iridóforos es una adaptación morfológica en el tegumento de la *R. temporaria* a las condiciones ambientales de la alta montaña, sin embargo es necesario continuar la investigación para cerciorarse de ello y averiguar su función (ver capítulo II).

Capítulo II. Función Adaptativa de la Piel de *R. temporaria* a la Alta Montaña.

1. Resumen

En este estudio se describe cómo los iridóforos de la piel de la *R. temporaria* disipan el exceso de energía de la radiación UV ambiental mediante la emisión de fluorescencia. Este mecanismo de protección representa un factor clave en la adaptación de anfibios a ambientes áridos, que proporcionará conocimiento universal sobre la función de los iridóforos en la piel. Los ejemplares de rana bermeja estudiados pertenecen a poblaciones de alta montaña en el Pirineo Central (Francia-España), en el límite meridional de su distribución a altitudes comprendidas entre 1500 y 2600 m s. n. m. Para llevar a cabo esta investigación, se utilizaron técnicas de microscopía electrónica de transmisión, microscopía óptica y de fluorescencia confocal.

Se concluye que los iridóforos son fluorescentes y fotoprotectores frente a la radiación UV, proporcionando a la piel de la rana un mecanismo específico de termorregulación. Esta función permite a las ranas adaptarse a ambientes de alta montaña, evitar el sobrecalentamiento de la piel y la pérdida de agua por evaporación (EWL).

Palabras clave. Cromatóforos, Guanina, Termorregulación, Radiación ultravioleta, Pérdida de agua

2. Introducción

Las poblaciones de anfibios en todo el mundo están en declive debido al estrés ambiental generado por el cambio climático, además los individuos que habitan en condiciones ambientales extremas son especialmente sensibles a estos factores (Rollins-Smith, 2017). La plasticidad fenotípica geográfica, la aclimatación y el comportamiento termorregulador influyen conjuntamente en la vulnerabilidad de las especies de anfibios

frente al cambio climático (Enriquez-Urzelai et al., 2020). Mejorar nuestro conocimiento sobre mecanismos de adaptación específicos nos permitirá desarrollar estrategias que contribuyan a la conservación de la biodiversidad. En este trabajo se describe cómo los iridóforos de la piel, tipo de cromatóforo, disipan el exceso de energía de la radiación de longitud de onda corta mediante la emisión de fluorescencia en poblaciones de gran altitud de *R. temporaria*. Este mecanismo específico actúa como fotoprotección contra la dañina radiación UV y evita el sobrecalentamiento de la piel, jugando un papel crucial en la supervivencia de esta especie en ambientes extremos. La rana bermeja, *R. temporaria* (Amphibia, Anura, Ranidae), es la especie de anfibio más extendida de Europa (Sillero et al., 2014). El límite meridional de su distribución se sitúa en la vertiente sur del Pirineo Central (entre los 1500 a los 2600 m s. n. m.), donde habitan las ranas estudiadas en el presente trabajo. Estos ambientes de montaña pirenaica están expuestos a altas dosis de radiación UV que afectan a todos los seres vivos que los habitan (Sommaruga y Psenner, 1997; Sommaruga, 2001).

La longitud de onda de la radiación UV atmosférica varía de 280 a 405 nm y puede representar hasta el 6% de la radiación solar global. La banda más dañina es la radiación UV-B con una longitud de onda de 290 a 320 nm y la más abundante es la radiación UV-A con una longitud de onda que oscila aproximadamente de 320 a 405 nm (Khogali y Al-Bar, 1992; Ben-Zvi et al., 2015). Estos rayos UV tienen que ser neutralizados por la piel mediante pigmentos con capacidad para absorber o reflejar la luz incidente. Los pigmentos de las ranas se localizan en cuatro tipos de células denominadas cromatóforos: los melanóforos con melanina, los xantóforos con pteridinas, los eritróforos con carotenoides y los iridóforos con guanina. Los pigmentos de los melanóforos, los xantóforos y los eritróforos absorben la luz, mientras que en los iridóforos reflejan la luz en todo su espectro (Bagnara et al., 1968; Duellman y Trueb, 1994; Bagnara y Matsumoto, 2006; Ligon y McCartney, 2016).

Los iridóforos son células que contienen en su citoplasma numerosas plaquetas reflectantes que en los anfibios están formadas por depósitos cristalinos de purinas, principalmente guanina, que caracterizan este orgánulo (Bagnara, 1966; Taylor, 1969;

Bagnara y Matsumoto, 2006). Las plaquetas de los iridóforos alternan con el citoplasma formando capas (plaqueta, citoplasma, plaqueta, etc.), cada capa tiene su propio índice de refracción provocando fenómenos de interferencia, de manera que una parte de la luz incidente se refleja con una longitud de onda característica denominada reflectancia (Land, 1972).

La reflectancia depende del índice de refracción de cada capa, del grosor de las capas, del ángulo de inclinación de las plaquetas reflectantes y del número de plaquetas apiladas (Huxley, 1968; Land, 1972; Fujii, 1993; Morrison, 1995; Khoo et al., 2014; Goda, 2017; Kuriyama et al., 2017). Cuando la luz reflejada es emitida con una longitud de onda más larga y de menor energía que la luz incidente, se producen fenómenos de fluorescencia (Lamb y Davis, 2020). Las plaquetas reflectantes de los iridóforos están formadas por depósitos cristalinos de guanina. Se ha demostrado que estas estructuras cristalinas emiten fluorescencia cuando se exponen a la luz UV tanto en compuestos sintéticos (Udenfriend y Zaltzman, 1962; Assenza y Brown, 1984; Giuliani et al., 2016; Rossbach et al., 2020) como en compuestos biológicos (Taboada et al., 2017; Rossbach et al., 2020).

Los fenómenos de fluorescencia de los iridóforos con guanina permiten a los animales disipar el exceso de energía de la luz UV y conlleva a una fotoprotección eficaz. Este fenómeno de fotoprotección ha sido descrito en la almeja gigante, *Tridacna maxima* (Bivalvia, Veneroida, Tridacninae) cuyos iridóforos contienen plaquetas reflectantes de guanina pura que actúan regulando el abastecimiento de luz UV, protegiéndola del daño tisular mediante un fenómeno de fluorescencia (Rossbach et al., 2020). En *H. viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) los iridóforos evitan el sobrecalentamiento reflejando la radiación UV (Kobelt y Linsenmair, 1986, 1992), y en *B. alvarengai* (Amphibia, Anura, Hylidae) el animal regula el intercambio de calor a través de la expansión y contracción de los melanóforos que modulan el efecto de los iridóforos (Centeno et al., 2015).

3. Material y Métodos

3.1 Generalidades

En esta investigación se logra describir el mecanismo fotoprotector que tiene lugar en la piel la *R. temporaria* frente a la radiación UV ambiental impulsado por los fenómenos de fluorescencia de los iridóforos estableciendo una metodología basada únicamente en técnicas de microscopía. Esta investigación se ha realizado en tres etapas:

a) Identificación general de los principales elementos en la dermis, caracterización de los iridóforos y su disposición espacial en el estrato esponjoso mediante micrografías electrónicas de transmisión.

b) Análisis de muestras de piel que presentan diferentes patrones de distribución de iridóforos utilizando micrografías de microscopía óptica.

c) Hallazgo de la fluorescencia de los iridóforos utilizando un microscopio de fluorescencia y determinación de su espectro de emisión utilizando un microscopio confocal.

3.2 Material

Los ejemplares utilizados (*R. temporaria*) en este estudio pertenecen a la colección de la Fundación Laboratorio de Anatomía Animal. Nuestro equipo los capturó durante las campañas de investigación realizadas en verano (en el mes de agosto) en el Pirineo Central (vertiente ibérica). Los especímenes se clasificaron en función de su tamaño (SVL): las ranas grandes son aquellas con $SVL \geq 5$ cm y las ranas pequeñas son aquellas con $SVL \leq 3,5$ cm. Todas las ranas pequeñas capturadas para realizar este estudio fueron localizadas en las proximidades de charcas rodeadas de densa vegetación, siendo este un ambiente más húmedo que los lugares de captura de las ranas de mayor tamaño. Se seleccionaron cinco ranas (Tabla 2) para obtener nueve muestras de piel tallada con una cuchilla (1 mm x 3 mm) como materia prima para estos experimentos. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones disponibles en el servicio de microscopía electrónica del C. A. C. T. I.

Tabla 2 Características del lugar de muestreo y de las muestras de piel en cinco especímenes de *R. temporaria*.

Lugar de muestreo (T _{max} , ° C)	Localización del área de estudio			Muestras				
	Altitud [m s. n. m.]	Localidad	Coordenadas	Rana	SVL	Id	Re	Área piel
Lagos glaciares (17,3° C)	2130	Ibón de las ranas	42° 48' 48.8880" N, 0° 16' 54.8280" W	E1	S	E1-1	D	N
					B	E4-1	D	Y
						E4-2	D	N
	2223	Ibónes de Anayet	42° 46' 36.0480" N, 0° 26' 34.1700" W	E2	S	E2-1	D	Y
	2564	Hoyas de Brazato	42° 44' 37.5060" N, 0° 12' 54.6720" W	E3	S	E3-1	D	Y
						E3-2	D	N
						E3-3	V	N
Fuentes y arroyos (21,8° C)	1794	Charcas de Formigal subiendo a Anayet	42° 47' 6.5400" N, 0° 23' 59.6520" W	E5	S	E5-1	D	Y
						E5-2	D	N

Nota. En el lugar de muestreo se indica la temperatura atmosférica máxima media diaria durante el mes de agosto (T_{max}, ° C). Las ranas se clasificaron según su tamaño, grande (B) SVL ≥ 5 cm y pequeño (S) SVL ≤ 3.5 cm. Id es la clave de la muestra de piel, Re es la región de piel dorsal (D) o ventral (V). Se diferencian dos tipos de área de piel, área con presencia de manchas melánicas (Y) y con ausencia de manchas melánicas (N).

3.3 Preparación de las Muestras

La preparación de las muestras de piel para su observación mediante técnicas de microscopía se realizó en tres pasos: a) Fijación del tejido, b) Inclusión del tejido en bloques de resina, c) Corte de los bloques y procesamiento de las secciones según la técnica de observación.

a) Proceso de fijación. Los fragmentos de piel se rehidrataron en series de etanol (90, 80, 70, 50, 30 y 15 %) durante 30 min por cada dilución a 4° C. Para desarrollar este protocolo experimental, se adaptó el protocolo estándar para el estudio de la piel de anfibios establecido por Bagnara et al. (1968). Los tejidos se fijaron durante 2 h en glutaraldehído al 6 % en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,2) y post-fijaron durante 5 h en tetróxido de osmio al 2 % en el mismo tampón. Tras la fijación, se procedió a la deshidratación en series de etanol (50, 75, 90, 95 y 100 %) durante 2 h en cada dilución a 4° C. Durante este proceso, el etanol disuelve las pteridinas (pigmentos amarillos) y se eliminan de los cromatóforos (Bagnara, 1966, 1976; Frost y Robinson, 1984; Bagnara et al. 2007).

b) Inclusión en bloques de resina. Las muestras de piel se sumergieron en diluciones en serie ascendente de resina Epon en óxido de propileno (1:3 v/v, 1:1 v/v, 3:1 v/v), se realizaron 3 repeticiones en cada dilución, durante 2 h a 4° C y utilizando un rotor de agitación. A continuación, se sumergieron en Epon puro durante 3 h a temperatura ambiente (utilizando el rotor de agitación) y durante 30 min a 60° C (sin rotor de agitación). Finalmente, se polimerizaron las muestras durante 48 h a 60° C.

c) Corte de los bloques y procesamiento de las secciones. Se cortaron secciones transversales semifinas (0,70 µm) de los nueve bloques de resina (E1-1, E2-1, E3-1, E3-2, E3-3, E4-1, E4-2, E5-1 y E5-2) utilizando un ultramicrotomo Reichert Ultracut S con cuchilla de vidrio. Estas secciones semifinas se tiñeron con azul de metileno para su observación con microscopía óptica. Para su observación mediante microscopía confocal y de fluorescencia, se preservó de la tinción con azul de metileno una serie de muestras obtenidas del bloque E5-2. Este protocolo de preparación de muestras conserva los cristales de guanina (Bagnara et al. 1968; Saenko et al. 2013; Teyssier et al. 2015).

Para las observaciones con MET se seleccionó el bloque E5-1. En primer lugar, se delimitó el área de estudio a observar por MET utilizando el microscopio óptico. A continuación, se cortaron secciones transversales ultrafinas (70-90 nm) del área seleccionada utilizando un ultramicrotomo Reichert Ultracut S con cuchilla de diamante. Las secciones ultrafinas se montaron sobre rejillas recubiertas con Formvar y se contrastaron

con acetato de uranilo acuoso al 0,5%, durante 30 min a 7° C y con citrato de plomo preparado según Reynolds (1963) durante 20 min a 7° C utilizando un sistema automatizado Leica EM AC20. Durante el contraste con el acetato de uranilo y el citrato de plomo, los cristales de guanina se disuelven y desaparecen lo que conlleva a la observación de las áreas vacías que ocupaban anteriormente (Saenko et al. 2013; Teyssier et al. 2015).

MET. Observación de la Ultraestructura de los Iridóforos

Las secciones ultrafinas procesadas se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 a 100 kV equipado con una cámara CCD Orius-Digital Montage Plug-in (Gatan Inc.) utilizando el software Gatan Digital Micrograph (Gatan Inc.).

MO. Estudio de los Patrones de Distribución de los Iridóforos

Las secciones semifinas teñidas con azul de metileno se examinaron utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 y fotografiaron con una cámara CCD Nikon DS-U2. A continuación, se analizaron los patrones de distribución de los iridóforos en función de diferentes factores: localización del área de estudio (altitud, localidad y coordenadas), características del lugar de muestreo (lagos glaciares, fuentes y arroyos) y temperatura atmosférica máxima media diaria durante el mes de muestreo. También se consideraron las características de las muestras de piel en los ejemplares estudiados: tamaño de la rana (SVL), área de la piel (dorsal, ventral) y la presencia o ausencia de manchas melánicas oscuras (Tabla 2).

En cada micrografía tomada de las muestras E1-1, E2-1, E3-1, E3-2, E3-3, E4-1, E4-2, E5-1 y E5-2, se midió una media de 7 áreas ($a = 0,0062 \text{ mm}^2$, $b = 0,05 \text{ mm}$, $h = 0,123 \text{ mm}$ donde b es la longitud de la muestra y h es la profundidad media), en las áreas de piel seleccionadas se contó el número de iridóforos y posteriormente se calculó el número medio de iridóforos por $0,0062 \text{ mm}^2$ (densidad de iridóforos) (Tabla 3). Las micrografías ópticas se analizaron utilizando el software ImageJ (Schneider et al. 2012), donde se identificaron un

total de 1960 iridóforos pertenecientes a 71 áreas. Seguidamente, se calcularon los incrementos porcentuales en la densidad de iridóforos en relación a los factores estudiados y se analizaron cómo afectan estos factores a los patrones de distribución de los iridóforos (Tabla 4).

Microscopía de Fluorescencia y Confocal

Previamente a la observación de las muestras, se eliminaron las pteridinas de la muestra (véase la sección 3.3), considerando que en otros estudios se observó en una sección semifina de la rana *S. nasicus* (*Amphibia*, *Anura*, *Hylidae*) que las pteridinas de los xantóforos emiten fluorescencia (Taboada et al., 2017). La eliminación de estos pigmentos permite atribuir la emisión de fluorescencia, si se detecta, de manera exclusiva a los iridóforos presentes en la muestra.

En primer lugar, se examinaron secciones semifinas del bloque E5-2 utilizando un módulo de Epi-Fluorescencia de un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 a través de tres fuentes de excitación: UV; azul; verde y rojo. En segundo lugar, se examinaron estas secciones con un Microscopio Óptico Confocal Leica SP5 para caracterizar el espectro de emisión de fluorescencia de los iridóforos. Las muestras fueron examinadas con tres fuentes láser diferentes en ocho frecuencias: Diodo UV a $\lambda_{\text{láser}} = 405$ nm (Ben-Zvi et al., 2015); Láser de Argón en los espectros del azul al amarillo ($\lambda_{\text{láser}} = 458, 476, 488, 496$ y 514 nm) y láseres de Helio-Neón en el espectro verde y rojo ($\lambda_{\text{láser}} = 543$ y 633 nm). A continuación se realizaron fotografías de la fluorescencia de los iridóforos. Para obtener la representación gráfica del espectro de emisión se procesaron las imágenes utilizando el software de Análisis de Imágenes Metamorph (Molecular Devices LLC, San José, CA).

4. Resultados

4.1 Descripción de la Ultraestructura de los Iridóforos en *R. temporaria*

La micrografía de MET es una sección transversal de la piel dorsal de *R. temporaria* (Figura 13) que muestra el estrato esponjoso de la dermis, donde se observan dos grandes iridóforos de forma redondeada y sus núcleos. Las áreas brillantes son los espacios vacíos que anteriormente ocupaban las plaquetas reflectantes rodeadas por el citoplasma, se pueden detectar porque sus cristales de guanina se disolvieron durante el procesamiento de la muestra. Se observan prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos que envuelven a los iridóforos y fibras musculares bien definidas en dirección ascendente hacia la epidermis. Las plaquetas reflectantes están dispuestas en grupos, su estructura principal tiene forma rectangular y están orientadas en diferentes ángulos respecto a la superficie de la piel: paralelos, oblicuos y perpendiculares. Durante estas observaciones con MET, se confirma que los iridóforos son muy numerosos (véase más adelante) y que se distribuyen en capas por todo el estrato esponjoso. El grosor de las capas varía de una a varias células. Estos resultados concuerdan con las observaciones de la microscopía óptica, como se muestra en la Figura 14.

4.2 Estudio de la Variabilidad en el Patrón de Distribución de los Iridóforos

Se identificaron cuatro factores que afectan al patrón de distribución de los iridóforos: el tamaño de la rana (SVL), la altitud, el área de la piel (dorsal y ventral) y la presencia o ausencia de manchas melánicas oscuras (Tabla 3).

Para analizar el efecto de los factores en la distribución de iridóforos, se expresó la variación en la densidad de iridóforos entre pares de muestras de piel como incrementos porcentuales (Tabla 4), lo cual permite analizar el efecto de estos factores en la distribución de iridóforos. Es importante tener en cuenta que algunos de los factores investigados muestran correlación con el lugar de muestreo y la temperatura máxima media diaria.

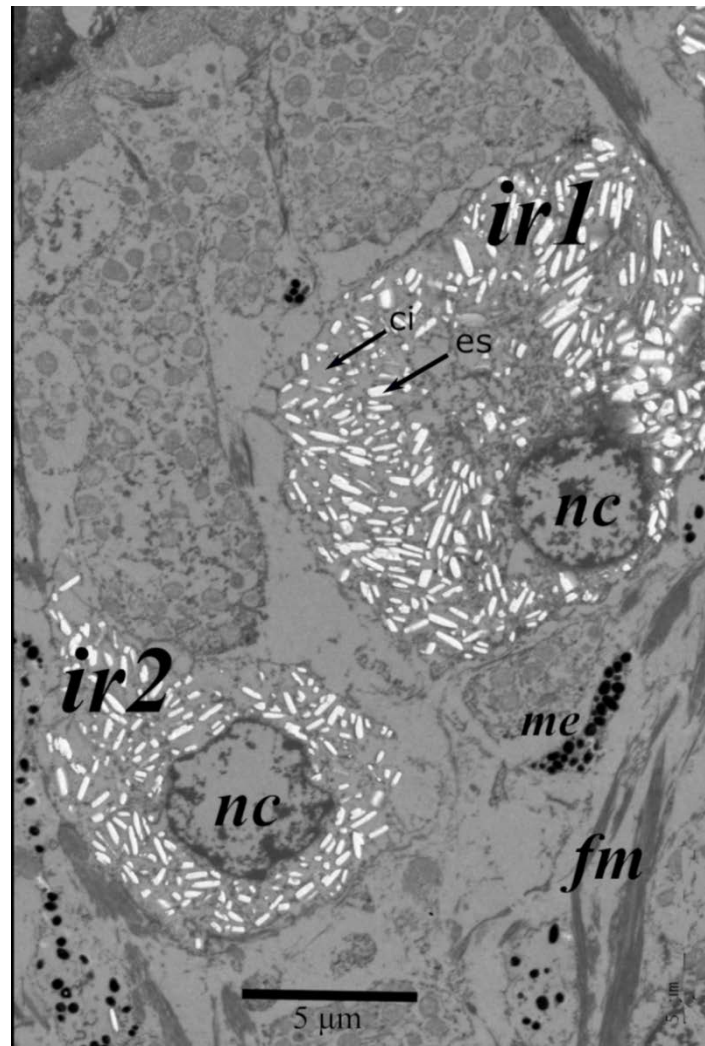


Figura 13 Micrografía MET de los iridóforos inmersos en el estrato esponjoso de la piel de *R. temporaria*. Se observan dos iridóforos (ir1 e ir2) y sus núcleos (nc), las áreas vacías (es) originadas tras la eliminación de las plaquetas cristalinas reflectantes durante el proceso de contrastado, el citoplasma (ci), las prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (me) y las fibras musculares (fm). Barra = 5µm.

Tamaño (SVL). El efecto de la SVL se analizó comparando las muestras E1-1 y E4-2. Estas muestras pertenecen a zonas de piel sin manchas melánicas oscuras en ranas que habitan en lugares de muestreo y altitudes similares, se observa que la densidad de iridóforos aumenta un 28,89% al aumentar el tamaño de la rana.

Altitud. El efecto de la altitud se estudió en las muestras E1-1 y E3-2. Estas muestras pertenecen a zonas de la piel sin manchas melánicas oscuras en ranas de tamaño similar y que habitan en lugares de muestreo similares. Al aumentar la altitud, la densidad de iridóforos aumenta un 45,87%.

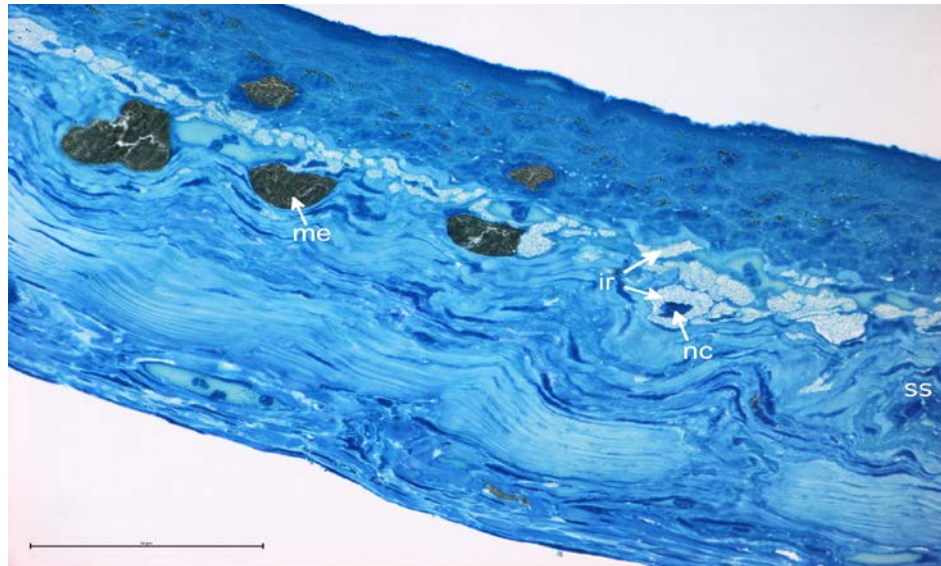


Figura 14 Sección transversal de la piel dorsal en área sin mancha de *R. temporaria*. Los melanóforos (me) se localizan debajo de los iridóforos. Los iridóforos (ir) se distribuyen en capas en el estrato esponjoso (ss). El grosor de las capas varía de una a varias capas de células. Se distinguen los núcleos de los iridóforos (nc). Azul de metileno. Barra = 50μm

Área de piel. Las regiones de piel ventral y dorsal tienen un patrón de distribución de los iridóforos diferente. Se compararon áreas de piel sin manchas melánicas oscuras en la misma rana en las muestras E3-3 (región ventral) y E3-2 (región dorsal). Se observa que la densidad de iridóforos aumenta en un 51,43% en la región dorsal respecto a la región ventral.

Patrón melánico. Se analizaron de dos en dos las áreas de tegumento con y sin manchas en ranas con un tamaño similar y que habitan en lugares y altitudes similares. Se compararon las muestras: E3-1 y E3-2, E4-1 y E4-2, E5-1 y E5-2. Se observa que la densidad de iridóforos aumenta entre un 11,97 y un 17,57% en las áreas con ausencia de manchas respecto a las áreas con manchas melánicas.

Tabla 3 Densidad de iridóforos calculado en las muestras de piel de cinco especímenes de *R. temporaria*.

Lugar de muestreo (T _{max} ° C)	Altitud [m s. n. m.]	Rana	SVL	Id	Área de piel	Mancha melánica oscura	Di
Lagos glaciares (17,3° C)	2130	E1	S	E1-1	D	N	21,8
		E4	B	E4-1	D	Y	23,9
				E4-2	D	N	28,1
	2223	E2	S	E2-1	D	Y	27,1
	2564	E3	S	E3-1	D	Y	28,4
				E3-2	D	N	31,8
				E3-3	V	N	21,0
Fuentes y arroyos (21,8° C)	1794	E5	S	E5-1	D	Y	30,7
				E5-2	D	N	35,6

Nota. En el lugar de muestreo se indica la temperatura atmosférica máxima media diaria durante el mes de agosto (T_{max}, ° C). Las ranas se clasificaron según su tamaño, grande (B) SVL ≥ 5 cm y pequeño (S) SVL ≤ 3,5 cm. Id es la clave de la muestra de piel, Re es la región de piel dorsal (D) o ventral (V). Se diferencian dos tipos de área de piel, área con presencia de manchas melánicas (Y) y con ausencia de manchas melánicas (N). La densidad de iridóforos (Di) es el número medio de iridóforos por 0,0062 mm².

4.3 Estudio de la Fluorescencia en los Iridóforos

En las secciones semifinas de piel dorsal de *R. temporaria*, se observa que los iridóforos emiten fluorescencia cuando se exponen al espectro UV. El mismo experimento, se realizó bajo otras fuentes de excitación de luz (azul, verde y roja) y no se detectó emisión de fluorescencia. Se observa que los melanóforos oscuros absorben todo el espectro de radiación.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de una sección semifina transversal no teñida de la piel dorsal de *R. temporaria* muestran que los iridóforos emiten fluorescencia azul brillante cuando se expone a la luz UV ($\lambda_{\text{láser}} = 405 \text{ nm}$) (Figura 15). Se montó una imagen sin teñir de la muestra con las imágenes obtenidas de la misma muestra con el microscopio confocal que permite confirmar que las estructuras responsables de la emisión de fluorescencia son los iridóforos (Figura 16). No se observa emisión de fluorescencia en ninguna otra estructura presente en esta sección, incluyendo los núcleos de los iridóforos y los melanóforos. El espectro de emisión de los iridóforos reveló que la excitación a 405 nm provoca la emisión de fluorescencia en el espectro azul visible en un rango de 440 a 520 nm (Figura 17). No se detectaron señales de fluorescencia bajo otras líneas de excitación láser.

Tabla 4 Factores que influyen en el patrón de distribución de los iridóforos.

Factores	Id	Pi [%]
Tamaño de la rana (SVL)	E1-1 y E4-2	28,89
Altitud [m s. n. m.]	E1-1 y E3-2	45,87
Área de piel	E3-3 y E3-2	51,43
Patrón melánico	E3-1 y E3-2	11,97
	E4-1 y E4-2	17,57
	E5-1 y E5-2	15,96

Nota. Clave de la muestra de piel (Id). Se calculó el incremento porcentual en la densidad de iridóforos entre pares de muestras de piel. Incremento porcentual (Pi), [%]
 $[Pi = 100(b-a)/a]$.



Figura 15 Imagen confocal de una sección transversal no teñida de la piel dorsal de *R. temporaria* observada bajo una fuente de excitación UV (λ láser = 405 nm). Los iridóforos (ir) emiten fluorescencia azul brillante. Barra = 100 μ

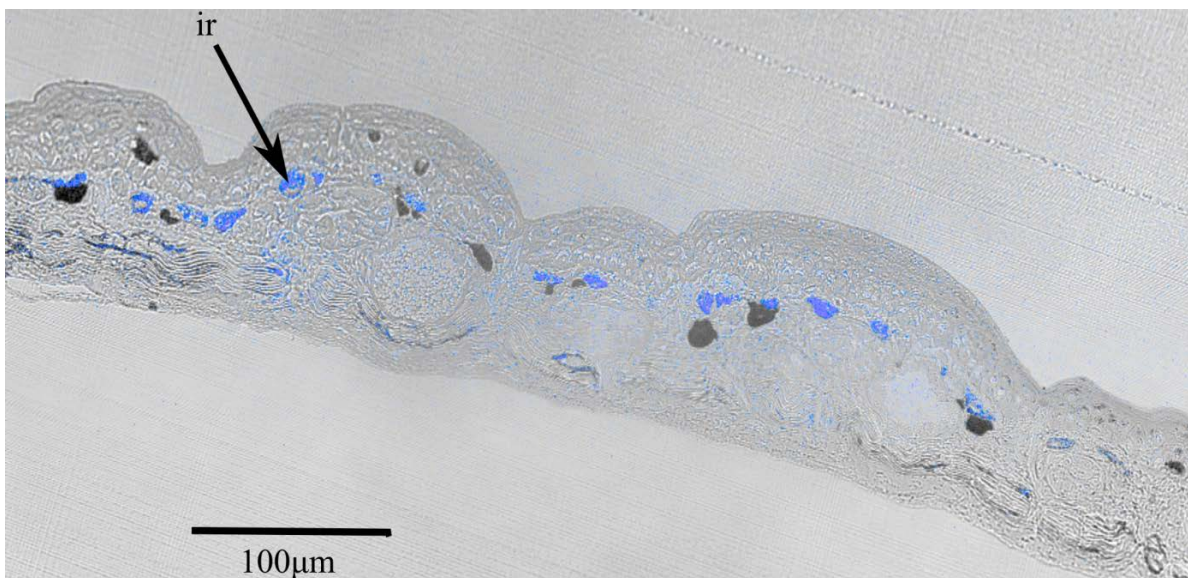


Figura 16 Sección transversal no teñida de la piel dorsal de *R. temporaria* superpuesta a la imagen confocal observada bajo una fuente de excitación UV (λ láser = 405 nm). Se visualizan los iridóforos (ir) emitiendo fluorescencia azul brillante y los melanóforos oscuros. Barra = 100 μ m.

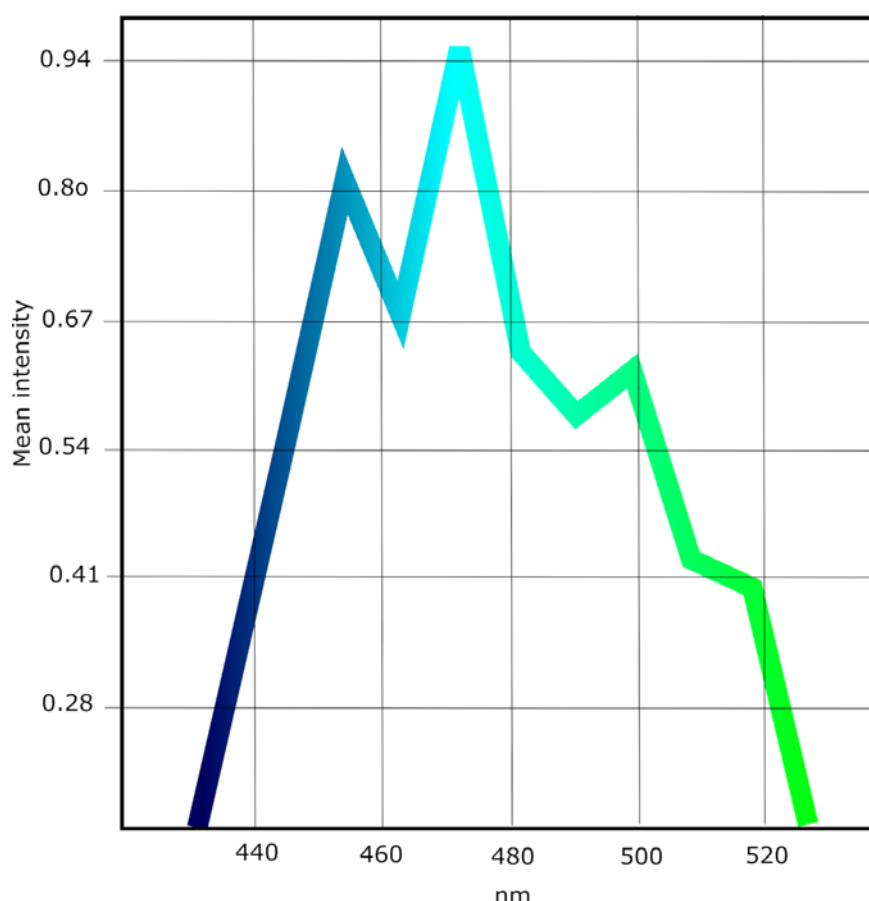


Figura 17 Espectro de emisión de los iridóforos de una sección de piel de *R. temporaria*. El eje X representa la longitud de onda [nm] de la radiación emitida en el ancho de banda de 440 a 520 nm por los iridóforos excitados con una fuente de radiación UV a 405 nm.

5. Discusión

5.1 Caracterización y Organización Espacial de los Iridóforos en la Dermis

Los iridóforos de la piel de *R. temporaria* son células constituidas por un gran núcleo y plaquetas reflectantes compuestas por cristales de guanina. Esos cristales se visualizan en la micrografía como numerosos espacios en blanco. Ello es consecuencia de la disolución y eliminación de los cristales durante el proceso de contrastado previo a la observación de la muestra, tal y como describen Saenko et al. (2013) y Teyssier et al. (2015). La ultraestructura de los iridóforos descrita en este estudio es similar a la descrita en anfibios (Bagnara, 1966; Bagnara et al., 1968; Taylor, 1969; Bagnara, 1976; Frost y Robinson, 1984; Kobelt y Linsenmair, 1986). También en otros animales como reptiles

(Morrison, 1995; Saenko et al., 2013; Teyssier et al., 2015; Kuriyama et al., 2017), peces (Fujii, 1993; Khoo et al., 2014; Goda, 2017), moluscos (Holt et al., 2014; Rossbach et al., 2020), crustáceos (en copépodos) según Gur et al. (2016), etc.

Los melanóforos tienen prolongaciones citoplasmáticas que rodean a los iridóforos como se describe en anfibios (Bagnara et al., 1968; Taylor, 1969; Bagnara, 1976). Las fibras musculares se disponen en dirección ascendente hacia la epidermis y se superponen a los cromatóforos como se observa en otros anfibios (Elkan, 1968; Duellman y Trueb 1994; Greven et al. 1995).

Las plaquetas reflectantes, generalmente rectangulares y organizadas en grupos, tienen diferentes ángulos de inclinación, como se describe en otros anfibios (Taylor, 1969; Bagnara, 1976; Nielsen y Dick, 1978; Frost y Robinson, 1984; Kobelt y Linsenmair, 1986). La variación del ángulo de inclinación determina la naturaleza de la función pigmentaria en los iridóforos.

Los iridóforos son numerosos y están apilados en varias capas de células. Este mismo fenómeno se observa en algunas ranas africanas que habitan en ambientes áridos: la rana de la sabana *H. viridiflavus* duplica el número de sus iridóforos para adaptarse a la estación seca (Kobelt y Linsenmair, 1986; Lampert y Linsenmair, 2002) y la rana de la estepa *C. petersii* (*Rhacophoridae*) tiene varias capas de iridóforos (Drewes et al., 1977). Estas adaptaciones reportadas en climas áridos representan mecanismos para evitar la EWL (Drewes et al., 1977; Kobelt y Linsenmair, 1986).

Por otro lado, se conocen especies idénticas de animales y plantas que comparten una distribución ártico-alpina (Schmitt et al., 2010), incluyendo algunas poblaciones de *R. temporaria* (Cogălniceanu et al., 2018), especie objeto de este estudio. Esto se debe a que en las regiones árticas y alpinas existen determinadas condiciones que son semejantes y/o necesarias para su vida activa. Los ambientes polares terrestres se han descrito como desiertos (Kennedy, 1993; Ayres et al., 2010), estando la distribución de los organismos en ambos lugares relacionada con la humedad (Kennedy, 1993) y por tanto con la EWL. La

EWL depende de las variables ambientales especialmente de la humedad relativa (Katz y Graham, 1980).

Al comparar los iridóforos de la *R. temporaria* con los de otros anuros, se concluye que su ultraestructura es similar a la de la mayoría de los anfibios, sin embargo el número y disposición espacial en la dermis se corresponde con anuros de zonas áridas. Esto se debe a que los ambientes de alta montaña pirenaica son áreas de dominio alpino que implican grandes oscilaciones térmicas circadianas (Oromi et al., 2015; Enriquez-Urzelai et al., 2020), un aumento de la radiación UV con la altitud (Marquis et al., 2008) y una humedad relativa muy baja durante el día (Duane et al., 2008). En conjunto, las condiciones climáticas de estos ambientes durante el mes de agosto (período del año en que se capturaron los ejemplares objeto de estudio) son similares a las condiciones climáticas en ambientes áridos como las sabanas africanas y los ambientes árticos.

En segundo lugar, la comparación entre el número de iridóforos en *R. temporaria* y otros anuros como *A. dacnicolor* (Phyllomedusidae), *B. orientalis* (Bombinatoridae), *D. arenicolor* e *H. cinerea* (Hylidae), *L. pipiens* y *R. japonica* (Ranidae) (Bagnara, 1976; Frost y Robinson, 1984; Sumida et al., 2016) resuelve que la *R. temporaria* tiene un mayor número de iridóforos que las otras especies. Teniendo en cuenta que la *R. temporaria* habita en el nivel alpino y en las regiones árticas, y que comparte una organización y número de iridóforos similar a las ranas que habitan en zonas áridas, se pueden relacionar los ambientes alpinos de alta montaña con los ambientes árticos y desérticos. Todos estos hábitats tienen un factor común, que es una humedad relativa baja que provoca una gran EWL durante el periodo de vida activa del animal.

Por lo tanto, se concluye que la presencia de un gran número de iridóforos es una adaptación de la *R. temporaria* para evitar la EWL, que le permite adaptarse a ambientes áridos de alta montaña o árticos que se encuentran situados en los límites de su distribución europea.

5.2 Los Patrones de Distribución de los Iridóforos

La densidad de iridóforos en la piel de la *R. temporaria* varía en función de diferentes factores. La densidad de iridóforos de la piel dorsal se incrementa con el tamaño de la rana, tal y como se ha descrito en la rana de la sabana africana *H. viridiflavus* (Kobelt y Linsenmair, 1986). Las ranas pequeñas de nuestra zona de estudio no se alejan de las charcas que están rodeadas de densa vegetación, lo cual les proporciona un ambiente muy húmedo y les permite mantener un menor número de iridóforos en relación a las ranas de mayor tamaño, que se alejan de los humedales y tienen que desarrollar mecanismos para evitar la EWL.

La densidad de iridóforos aumenta casi un 50% (45,87 %) al ascender aproximadamente 500 m s. n. m. A mayor altitud, disminuye la humedad relativa y aumenta la radiación UV, influyendo ambas variables en la EWL. Un aumento en la densidad de iridóforos implica un aumento en la reflexión de la radiación solar a través de los iridóforos disminuyendo la EWL (Tracy 1976; Tattersall et al. 2006). En la piel dorsal aumenta fuertemente la densidad de iridóforos en comparación con la piel ventral, al igual que se observó en *H. viridiflavus* (Kobelt y Linsenmair, 1986). Esto se debe a que la piel ventral de la *R. temporaria* está continuamente en contacto con el sustrato húmedo y no recibe insolación de manera directa, por lo que no necesita una gran protección frente a la EWL.

La densidad de iridóforos bajo las manchas melánicas es menor que en las áreas sin manchas, como se ha descrito en los anuros *B. orientalis*, *Oophaga* sp. (*Dendrobatidae*), *Ptychadena mascareniensis* (*Ptychadenidae*), *L. clamitans* y *L. pipiens* (*Ranidae*) según Smith-Gill et al. (1972), Richards y Nace (1983), Frost y Robinson (1984) y Posso-Terranova y Andrés (2017). Las manchas melánicas oscuras en *R. temporaria* tienen una función mimética (Dawes, 1941a) y se deben a fenómenos de plasticidad fenotípica que no están relacionados con variables ambientales como la altitud (Alho et al., 2010). Al aumentar la superficie de las manchas melánicas, disminuye el número total de iridóforos. Teniendo en cuenta que los individuos con patrones melánicos alcanzan temperaturas más elevadas

cuando se exponen a la radiación solar (Vences et al., 2002; Clusella-Trullas et al., 2007), se puede concluir que estos patrones de manchas oscuras están limitados por la humedad relativa baja y por la radiación UV, existiendo un equilibrio entre la EWL y el mimetismo que limita la variabilidad de los patrones melánicos. En vista de lo anterior, se puede afirmar que existe una correlación entre el aumento de la densidad de iridóforos y los factores ambientales que conducen a una menor humedad relativa del ambiente, por lo que se concluye que los iridóforos son un mecanismo de protección frente a la EWL.

5.3 La Fluorescencia de los Iridóforos

Los cristales de guanina que conforman las plaquetas reflectantes de los iridóforos de la piel en la *R. temporaria*, provocan la emisión de fluorescencia azul cuando se exponen a la luz UV. La emisión de fluorescencia se localiza en el citoplasma de la célula, no observándose en los núcleos. La emisión de fluorescencia en los iridóforos sólo tiene lugar bajo la excitación con luz UV, lo que permite concluir que los iridóforos son estructuras especializadas en disipar este tipo de radiación.

El espectro de emisión UV de los iridóforos ($\lambda_{\text{láser}} = 405 \text{ nm}$) de la muestra de piel, visualiza que los iridóforos absorben casi toda la radiación UV y emiten energía en un rango de 440 a 520 nm. Otros autores han observado el mismo fenómeno en los tejidos que presentan iridóforos con guanina en la almeja gigante *T. máxima*, en cuyo espectro de emisión a $\lambda_{\text{láser}} = 325 \text{ nm}$, los valores de emisión están en un rango de 391 a 530 nm (Rosbach et al., 2020), este fenómeno lo interpretan como un mecanismo de fotoprotección. Por tanto, se concluye que la fluorescencia de los iridóforos en *R. temporaria* es un mecanismo de fotoprotección frente a la radiación UV.

6. Conclusiones

El objetivo de este trabajo ha concluido con éxito pues utilizando técnicas modernas de microscopía se demuestra la función protectora de los iridóforos en *R. temporaria* frente a la EWL.

La fluorescencia que emiten los iridóforos es un indicador de un mecanismo específico de fotoprotección a través de la disipación de la radiación UV, mediante el cual se evita el daño a los tejidos y se previene el sobrecalentamiento de la piel.

Las conclusiones de este estudio resultan innovadoras porque se muestra el primer reporte de fluorescencia de los iridóforos en la piel de los anfibios y se demuestra que el incremento de la densidad de iridóforos es un mecanismo de adaptación fotoprotector que permite a la especie adaptarse a ambientes áridos de alta montaña o árticos situados en los límites de su distribución europea.

Capítulo III. Polimorfismos de Color en *R. temporaria*

1. Resumen

En este estudio, se evalúa la variabilidad del color de la piel como un indicador de la diversidad fenotípica. Las poblaciones de rana común europea (*R. temporaria*) de la vertiente sur del Pirineo Central habitan en el límite de distribución de la especie en latitud y altitud. Se investiga la relación entre la tipología del color de la piel y diferentes variables ambientales, este análisis revela que la variabilidad del tipo de piel disminuye en las ranas que se desarrollaron en cuerpos de agua temporales respecto a las ranas cuyo desarrollo tuvo lugar en cuerpos de agua permanentes.

Los resultados obtenidos señalan que este método puede ser utilizado como una técnica de estudio no invasiva de la diversidad fenotípica y sugieren que una metamorfosis temprana de los renacuajos, como adaptación a la desecación del hábitat, puede tener efectos negativos en la diversidad fenotípica de los adultos.

Estos resultados demuestran que el acceso a cuerpos de agua permanentes es importante para evitar la pérdida de diversidad en poblaciones de anuros y reducir su vulnerabilidad frente a los impactos ambientales y los patógenos.

Palabras clave. Anuro, *R. temporaria*, Plasticidad fenotípica, Coloración de los animales, Conservación de anfibios

2. Introducción

Los anfibios se han convertido en motivo de gran preocupación en los últimos años debido al fuerte descenso de sus poblaciones en todo el mundo y a sus elevadas tasas de extinción. Algunas estimaciones sugieren que las tasas de extinción de anfibios actuales son mucho mayores que las tasas de fondo (McCallum, 2007) y que la pérdida de especies actualmente amenazadas puede llevar a niveles de extinción masiva de pérdida de

biodiversidad (Barnosky et al., 2011). Este rápido declive de las poblaciones de anfibios es consecuencia de la especial vulnerabilidad de numerosas especies de anfibios a los cambios ambientales e impactos antrópicos (Wake y Vredenburg, 2008). Las poblaciones de montaña son particularmente sensibles a perturbaciones medioambientales. Su hábitat está naturalmente fragmentado, y las especies alpinas frecuentemente están adaptadas a un nicho micro climático reducido, lo cual combinado con la zonación natural que ocurre con la altitud implica que el conjunto de plantas y animales en áreas de elevada altitud sea más frágil que sus equivalentes de baja altitud. Se ha demostrado que las poblaciones alpinas de anuros son especialmente sensibles a la introducción de especies invasoras y a epidemias causadas por alteraciones ambientales (Knapp y Matthews, 2000; Bosch et al., 2007). La monitorización de poblaciones vulnerables es un esfuerzo importante si queremos comprender los factores que conducen al declive de los anfibios. La rana común europea, *R. temporaria*, es la especie de anuro más extendida de Europa (Sillero et al., 2014). Esta investigación trata de las poblaciones de *R. temporaria* de la vertiente sur del Pirineo Central, que se encuentra en el límite de distribución de la especie en latitud y altitud. El estudio de poblaciones salvajes requiere el desarrollo de herramientas de monitorización eficaces que puedan ser aplicadas sin dañarlas. El objetivo específico de este trabajo es desarrollar y probar un método para estudiar el color de la piel en *R. temporaria* como indicador de la diversidad fenotípica.

El polimorfismo del color y el patrón dorsal están ampliamente extendidos entre los anuros, y se ha sugerido con anterioridad como un método para estudiar la variación fenotípica en estos animales (Hoffman y Blouin, 2000). Estos patrones y colores están determinados por estructuras tegumentarias que contienen pigmentos conocidos como cromatóforos (Duellman y Trueb, 1994). En los anfibios hay tres tipos principales de cromatóforos: los xantóforos más externos y localizados justo debajo de la lámina basal, los iridóforos situados debajo de los xantóforos y los melanóforos localizados directamente bajo los iridóforos y que extienden procesos celulares hacia arriba que rodean a ambos tipos de cromatóforos (Bagnara, 1976).

Cuando la luz incide en la superficie de una rana, una parte de las longitudes de onda corta (azul-violeta) son absorbidas por la capa de xantóforos que actúa como filtro, y las restantes son dispersadas por las plaquetas reflectantes que se encuentran en el interior de los iridóforos. Las longitudes de onda larga (rojo-naranja) son absorbidas por la capa de melanina. Como resultado, las longitudes de onda intermedia (amarillo-verde) pasan libres a través de los xantóforos y la mayoría son reflejadas por los iridóforos, apareciendo los animales de este color (Bagnara y Hadley, 1973). Factores como la morfología de la piel y la cantidad y distribución de los distintos tipos de cromatóforos determinan el color final del animal. Estos factores pueden variar dependiendo de la genética, la fisiología y el ambiente, y reflejan la variabilidad fenotípica de las poblaciones. En el presente artículo, se utiliza un nuevo método de análisis para evaluar y clasificar la coloración de las ranas muestreadas de las poblaciones de estudio. La presencia y cantidad relativa de los distintos tipos de piel se utilizó como variable independiente en un estudio exploratorio que prueba si hay alguna relación entre uno o más factores ambientales y la variabilidad fenotípica medida con estos métodos.

3. Material y Métodos

3.1 Animales y Muestreo

Los muestreos se realizaron entre finales de julio y principios de agosto de 2014. El periodo de muestreo fue seleccionado teniendo en cuenta que la época de reproducción de la *R. temporaria* en el Área A (altitud media 1600 m s. n. m.) tiene lugar entre marzo y abril, y en el Área B (altitud media 2400 m s. n. m.) sucede entre mayo y junio. Se recogieron datos de 373 individuos de *R. temporaria*, todos mayores de un año de edad, de los cuales 336 eran subadultos y 37 eran adultos maduros sexualmente. En las ranas subadultas no se pudo determinar ni el sexo morfológico (caracteres sexuales secundarios no visibles), ni el sexo genético [inversión sexual dependiente de la temperatura (Wallace et al., 1999)]. Se

muestrearon 30 localidades distribuidas en dos áreas geomorfológicas en la ladera sur del Pirineo Central (Figura 18).

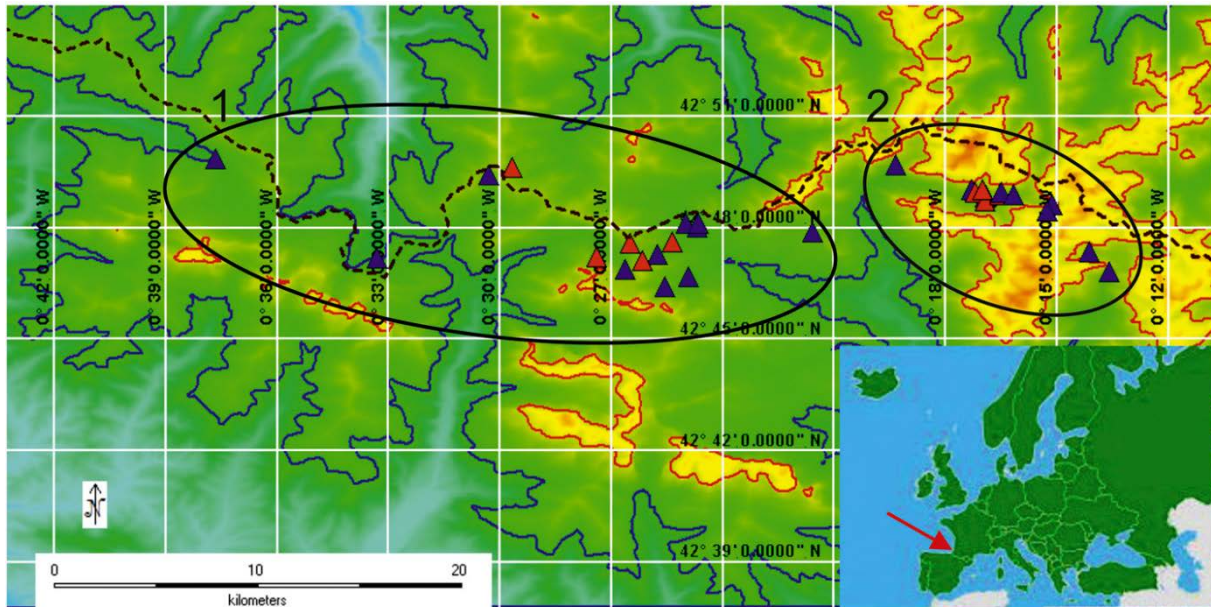


Figura 18 Mapa del área de estudio y puntos de muestreo en la ladera sur del Pirineo Central. El mapa pequeño en la esquina inferior derecha indica la localización aproximada del área estudiada. Los triángulos en la imagen principal señalan la ubicación de los puntos de muestreo. Los triángulos rojos designan los cuerpos de agua temporales y los triángulos azules los cuerpos de agua permanentes. Los trazos discontinuos delimitan la frontera entre España y Francia. Las elipses negras acotan las dos áreas de estudio principales: Aguas Tuertas - Portalet (Área A) y Formigal - Bachimaña (Área B). Las líneas de altitud en azul se corresponden a 1600 m s. n. m. y las que están en rojo a 2400 m s. n. m.

En las 30 localidades muestreadas se diferencian dos tipos de cuerpos de agua: permanentes y temporales. Los cuerpos de agua permanentes son lagos de origen glaciar, de mayor tamaño que los temporales y generalmente reciben suministro de agua durante todo el año, mientras que los cuerpos de agua temporales son lagunas y arroyos, de menor tamaño y se originan a partir de fuentes de agua. Estos cuerpos de agua temporales surgen a partir de parches de nieve derretida, cuando el agua se filtra y aflora a la superficie formando lagunas y arroyos que permanecen en el Área A hasta finales de mayo y en el Área B hasta principios de agosto. En esta época se produce un descenso del nivel del agua

en ambas áreas de estudio y se originan cuerpos de agua temporales a partir de la desecación de meandros abandonados.

Los cuerpos de agua permanentes tienen un rango de tamaño de 300 a 6000 m² y los cuerpos de agua temporales de 5 a 300 m². Cuando los cuerpos de agua temporales desaparecen las ranas no migran debido a las barreras físicas del entorno y en su lugar buscan la humedad en galerías abandonadas y bajo las piedras, a la espera de las lluvias de finales de agosto. Esto les proporciona un santuario temporal alejado de los pequeños mamíferos y otros depredadores y permite a las ranas prepararse para el periodo de hibernación que comienza a principios de septiembre, cuando llegan las primeras nevadas.

Las ranas muestreadas representan el número total de individuos encontrados durante las expediciones de senderismo realizadas. Los animales se localizaron tanto en la tierra como en la orilla, fueron capturadas con una red fina y procesados en tandas de 10 - 20 individuos. Debido a que se conoce que los niveles de humedad influyen en la coloración de la *R. temporaria* (Rowlands, 1952), los individuos se mantuvieron constantemente húmedos durante 30 - 60 min en una bolsa fina de tela antes de ser fotografiados. Las fotografías se realizaron sobre una cuadrícula blanca portátil (para el ajuste de la escala) con una cámara digital Canon PowerShot SX260 HS. Todas las fotografías se realizaron entre las 12:00 y las 14:00 a plena luz solar en días sin cobertura nubosa y con la cámara configurada en modo auto-exposición, con el fin de minimizar cualquier efecto debido a diferencias en la iluminación ambiental y generar fotografías con una exposición regular. Debido a que la *R. temporaria* muestra dicromatismo cromático durante la época de reproducción (Bell y Zamudio, 2012), las fotografías se realizaron entre finales de julio y principios de agosto. Las fechas seleccionadas están muy alejadas del periodo de reproducción de esta población, que tiene lugar al principio de junio tras la fundición de la capa de nieve. Las imágenes digitales resultantes fueron procesadas y analizadas utilizando el programa GIMP 2.8 Open Source Image Editor. Una vez realizadas las fotografías, las ranas fueron liberadas inmediatamente sin más manipulaciones.

En el mapa del área de estudio (Figura 18) los lugares de muestreo se visualizan próximos entre sí, sin embargo las ranas tienen limitada su dispersión debido a la fragmentación severa de los hábitats de montaña en la ladera sur del Pirineo Central y a la frecuente presencia de barreras físicas (precipicios, canchales y parches de nieve). Es importante resaltar que no se localizaron especímenes alejados de los cuerpos de agua, y que la mayoría de las ranas capturadas en tierra se hallaron a una distancia aproximada de 10 m de los cuerpos de agua, coincidiendo con las observaciones de Vences et al. (1999). Por lo tanto se puede asumir que la mayoría de los especímenes recolectados en las cercanías de los cuerpos de agua nacieron allí.

3.2 *Análisis del Color*

Se recortó un área fotográfica (200 × 200 píxeles) utilizando una herramienta de recorte, seleccionando desde el nivel de los ojos hasta las extremidades traseras (excluyendo las extremidades), de manera que sólo se analizó la superficie dorsal del cuerpo de la rana (Figura 19, primera columna). Este área fue seleccionada cuidadosamente para excluir las manchas dorsales oscuras, ya que este análisis está focalizado en el color base de la piel, y no el patrón dorsal de manchas melánicas (véase capítulo IV).

Para representar el color de las imágenes digitales se pueden utilizar diferentes modelos de color (Montgomerie, 2006). En este trabajo se utiliza el modelo de color RGB para el análisis de color. Aunque el color RGB está diseñado para el sistema visual humano y puede que no explique el color de los anfibios o depredadores (Endler, 1990), permite medir las diferencias en el color, que es el único requisito para cumplir el objetivo de comparar diferentes subconjuntos de animales. Para crear un histograma de color del área seleccionada en la superficie de la piel, se utilizó la herramienta “histograma” del GIMP 2.8 que ayudará a definir la coloración de cada una de las ranas estudiadas en un espacio RGB tridimensional (Figura 19, segunda columna).

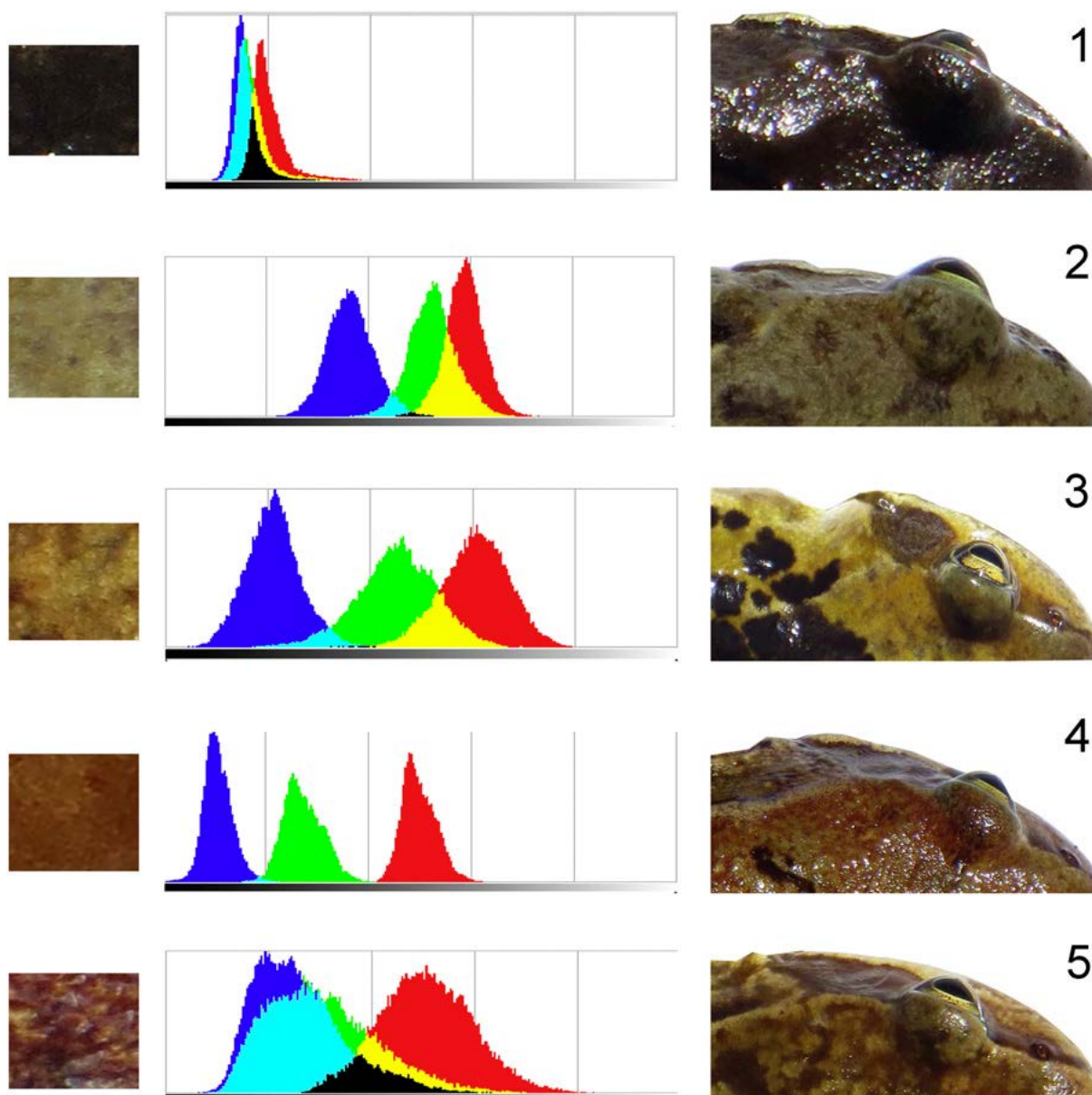


Figura 19 Ejemplos de los tipos de piel definidos en el análisis de la coloración dorsal. La primera columna muestra la imagen utilizada para el análisis de color y la segunda columna su correspondiente histograma RGB. La tercera columna es una fotografía parcial del animal del que se tomaron los datos.

3.3 Análisis Estadístico

Los histogramas que muestran los datos RGB se procesaron con el programa MorphoJ (Oracle Corporation) utilizando como puntos de referencia el punto máximo en el eje-y y el punto más a la izquierda en el eje-x de la curva de intensidad en cada color (azul, verde y rojo).

Los análisis estadísticos subsiguientes se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS, versión 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) para Windows. Para determinar los componentes principales y su dimensión de variación se realizó un análisis de Procrustes utilizando los puntos de referencia. Este proceso permite definir las variables principales que se pueden utilizar para agrupar los histogramas en grupos significativamente diferentes. El análisis reveló que el componente principal del análisis de varianza de Procrustes estaba altamente correlacionado con el desplazamiento de las curvas roja y azul respecto a la curva verde.

A continuación se realizó un análisis de conglomerados jerárquico utilizando dos variables: la distancia entre las medianas de los picos verde y rojo en el eje de intensidad y la distancia entre las medianas de los picos verde y azul en dicho eje, como consecuencia los histogramas se agruparon en cinco clúster distintivos (Figura 19). Estos cinco clúster sirvieron de base para realizar un análisis discriminante utilizando una matriz de covarianza intra-grupos. Este análisis permitió separar los casos estudiados en los cinco clústeres con un alto grado de significación (Lambda de Wilks = 0,022; $p < 0,000$). Con el fin de evitar posibles factores de confusión al realizar sucesivos análisis, como pequeños cambios de color relacionados con el ambiente, se descartaron los casos con una certeza menor del 90 % de pertenecer a algún clúster, reduciendo así el número total de casos a 173. El análisis discriminante reveló que las funciones 1 y 2 estaban altamente correlacionadas con las variables azul-verde (0,985) y verde-rojo (0,947) (Figura 20). Estos grupos se utilizaron para analizar la distribución de los distintos tipos de piel en subpoblaciones de *R. temporaria* en función de las siguientes variables:

Geología. El área de estudio está dividida en dos sectores principales con diferente geomorfología, un primer sector dominado por rocas calcáreas y areniscas, y un segundo sector donde predominan los granitos.

Altitud. El Área A tiene una altitud media de 1600 m s. n. m. y Área B una altitud media de 2400 m s. n. m.

Tamaño de la rana (SVL).

Tipo de cuerpo de agua. Temporal (fuentes y arroyos) o permanente (lagos glaciares) donde se capturó la rana.

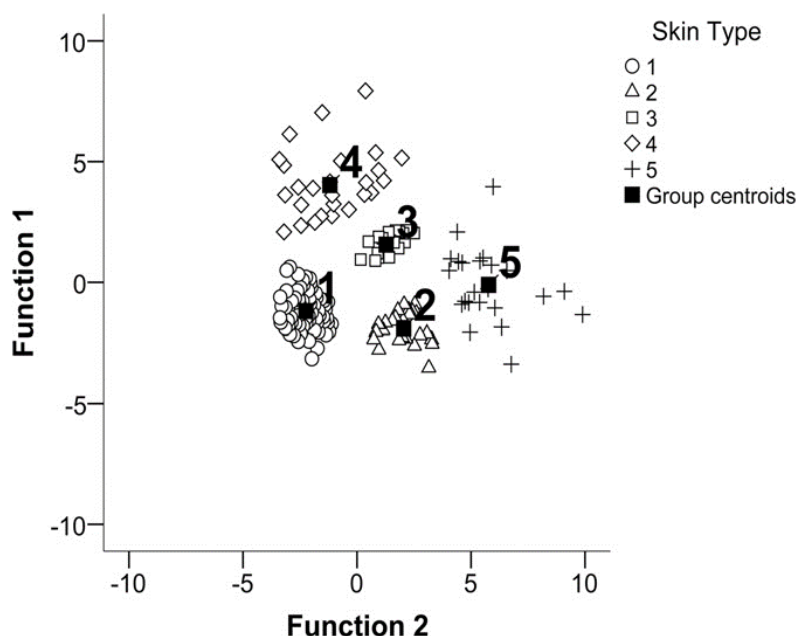


Figura 20 Análisis de componentes principales de los casos seleccionados que muestran la clasificación en torno a cinco grupos diferentes de tipos de piel. La Función 1 representa en un 0,985 la distancia entre el azul y el verde y la Función 2 representa en un 0,947 la distancia entre el verde y el rojo. Las distancias se refieren a las distancias de los histogramas RGB (Figura 19, segunda columna).

4. Resultados

El análisis de las variables entre las dos áreas principales reveló diferencias significativas en la geología (Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,001$; V de Cramer = 0,880), la altitud (ANOVA de una vía, $p < 0,001$; $F = 74,734$), la temporalidad de los cuerpos de agua (Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,001$; V de Cramer = 0,292) y la distribución de los tipos de piel (Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,001$; V de Cramer V = 0,328). La dependencia entre las variables en cada área se analizó por separado con el fin de evitar que las áreas actúen

como factores de confusión durante el análisis de datos. La localización geográfica de cada área, Área A (Aguas Tuertas - Portalet) y Área B (Formigal - Bachimaña), se puede observar en la Figura 18. Es importante destacar que el tamaño (SVL) no mostró diferencias significativas entre áreas (ANOVA de una vía, $p < 0,748$; $F = 0,103$). La distribución del color de la piel en los individuos estudiados fue completamente dependiente de la temporalidad de los cuerpos de agua en el área de muestreo (Área A: Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,001$; V de Cramer = 0,494 y Área B: Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,001$; V de Cramer = 0,549). Algunas variables mostraron dependencia dentro de una de las áreas pero no en la otra, como fue en el caso de la SVL (Área A: ANOVA de una vía, $p = 0,053$; $F = 2,453$ y Área B: ANOVA de una vía, $p < 0,001$; $F = 7,250$) y la altitud (Área A: ANOVA de una vía, $p < 0,001$; $F = 6,120$ y Área B: ANOVA de una vía, $p = 0,061$; $F = 2,344$). En el Área B, el único área que presentó variación del sustrato geológico entre los lugares de muestreo, no hubo relación entre la geología y la distribución del color de la piel (Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,188$; V de Cramer = 0,260).

Por otro lado, aunque las ranas muestreadas fueron principalmente subadultos, se pudo analizar la SVL entre sexos en 37 individuos adultos dentro de ambas áreas (representando el 9,91 % del número total de ranas estudiadas). No se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras (SVL media de machos = 6,16 cm, Desviación estándar = 0,63 cm; SVL media de hembras = 5,67 cm, Desviación estándar = 1,24 cm).

El tamaño del cuerpo de la rana (medido como la SVL) mostró una dependencia constante en ambas áreas para la altitud (Área A: ANOVA de una vía, $p = 0,001$; $F = 3,007$ y Área B: ANOVA de una vía, $p < 0,001$; $F = 10,778$) y la temporalidad de los cuerpos de agua (Área A: ANOVA de una vía, $p = 0,041$; $F = 4,331$ y Área B: ANOVA de una vía, $p < 0,001$; $F = 44,494$). En el Área B no hubo dependencia del tamaño del cuerpo de la rana con el sustrato geológico (ANOVA de una vía, $p = 0,097$; $F = 2,815$).

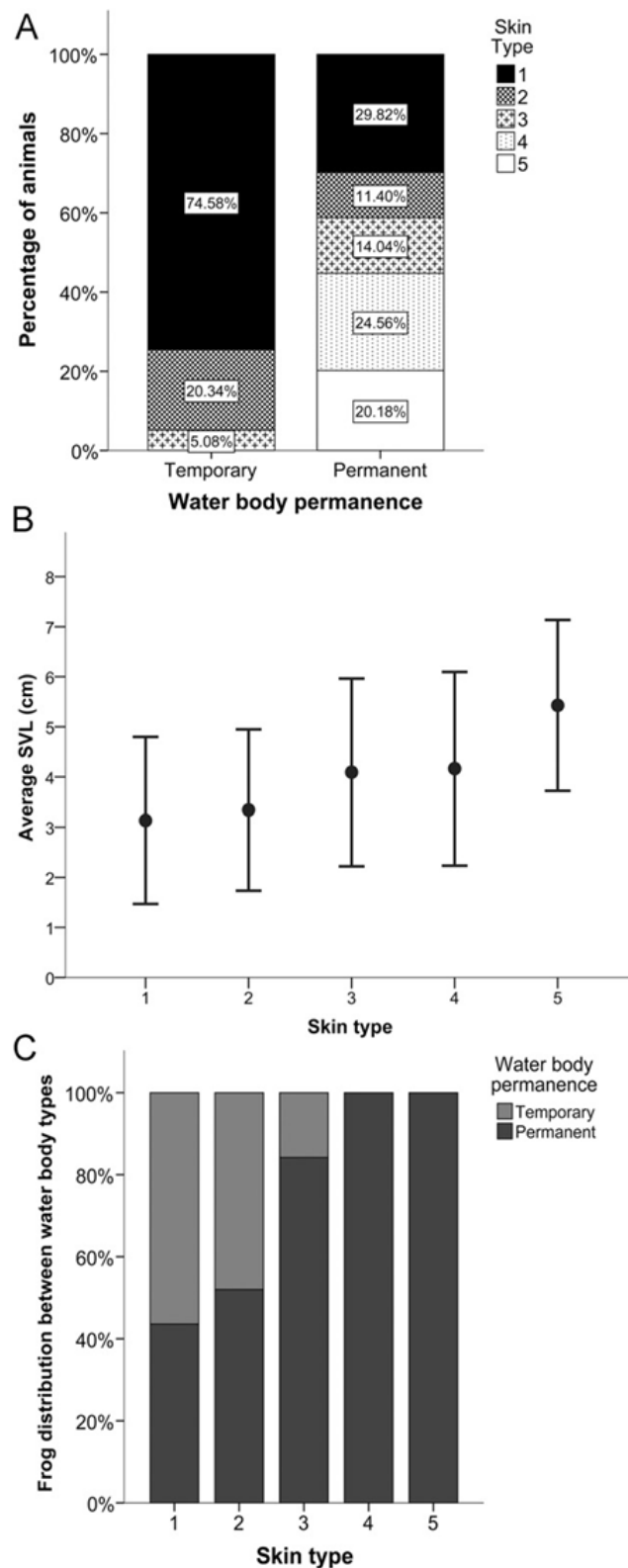


Figura 21 Relación entre el tamaño del cuerpo, el color y la temporalidad del cuerpo de agua. A) Se muestra el porcentaje de animales con cada tipo de piel en cuerpos de agua temporales y permanentes. B) Se representa la SVL media (cm) en cada tipo de piel. Las barras de error son la desviación estándar. C) Porcentaje de ranas con cada tipo de piel en cuerpos de agua temporales o permanentes.

Finalmente, se observó una dependencia significativa y constante entre la altitud y la temporalidad de los cuerpos de agua (Área A: ANOVA de una vía, $p < 0,001$; $F = 38,098$ y Área B: ANOVA de una vía, $p < 0,001$; $F = 19,820$).

De todas las variables examinadas, el único factor que tiene mayor efecto y consistencia en la variedad y distribución de los tipos de piel fue la temporalidad de los cuerpos de agua (Figura 21 A). Las ranas encontradas cerca o dentro de los cuerpos de agua permanentes tenían los cinco tipos de piel, con una mayoría del tipo 1 (29,82 %), seguidos de los tipos 4 y 5 (24,56 % y 20,18 % respectivamente) y una pequeña proporción de los tipos 2 y 3 (11,40 % y 14,04 % respectivamente). Por otra parte, las ranas localizadas cerca o dentro de los cuerpos de agua temporales únicamente tenían los tipos 1, 2 y 3, estando ausentes los tipos 4 y 5 (Figura 21 A). La gran mayoría de las ranas (75 %) tenían pieles del tipo 1, seguidas del tipo 2 (20,34 %) y una proporción muy pequeña del tipo 3 (5,08 %).

5. Discusión

Los resultados de este trabajo demuestran que se puede medir el color de la piel dentro de las poblaciones estudiadas de *R. temporaria*, que el color de la piel es suficientemente diverso como para poder dividirse en tipos específicos, y que la presencia y abundancia de los tipos de piel varía a través de las diferentes áreas y ambientes. Por lo tanto, se puede utilizar la variabilidad del color entre poblaciones como un recurso de evaluación de la diversidad fenotípica utilizando métodos no invasivos. Particularmente, se averiguó que la distribución del tipo de piel y el tamaño corporal dependen en gran medida de si los cuerpos de agua donde se capturaron los individuos eran temporales o permanentes. Se conoce que las larvas de anfibios manifiestan una alta plasticidad fenotípica en respuesta a la desecación del hábitat, los individuos que se desarrollan en cuerpos de agua temporales experimentan una metamorfosis temprana y un menor tamaño respecto a los que se desarrollan en cuerpos de agua permanentes (Newman, 1989). Esta

plasticidad está sujeta a una presión selectiva muy fuerte, pues la desecación del hábitat induce la muerte en los individuos no metamorfoseados, mientras que aquellos que alcanzan la metamorfosis con un mayor tamaño corporal consiguen una mayor aptitud. De hecho, se ha sugerido que este factor ambiental configura la estructura genética de las poblaciones que tienen que enfrentarse a esta compensación (Palo et al., 2003; Lind et al., 2011; Lind y Johansson, 2011), y que las poblaciones especializadas en un desarrollo rápido y una metamorfosis temprana con un tamaño metamórfico reducido exhiben un menor grado de plasticidad fenotípica (Lind y Johansson, 2007). Los resultados del presente trabajo confirman el mismo caso en las poblaciones estudiadas, ya que existe una diferencia de tamaño significativa, acorde con un menor tamaño del individuo en la metamorfosis, entre las ranas localizadas en los cuerpos de agua temporales y en los cuerpos de agua permanentes (Figura 21 A y B). Además, en las localidades muestreadas existen barreras físicas entre los lagos permanentes y las charcas temporales que no permiten a las ranas alcanzar un cuerpo de agua diferente (Figura 22).



Figura 22 Comparación de los cuerpos de agua permanentes (lado izquierdo) y temporales (lado derecho) del área de estudio en la ladera sur de los Pirineos.

La temporalidad de los cuerpos de agua también tuvo un efecto significativo en la distribución del color de la piel. Se observó que el tamaño corporal estaba relacionado con la distribución del color de la piel solamente en una de las áreas, mientras que la relación entre

la distribución del color de la piel y la temporalidad de los cuerpos de agua fue consistente en ambas áreas. Por tanto, es muy probable que la relación entre la SVL y la distribución del color de la piel en el Área B sea una consecuencia del efecto de la temporalidad de los cuerpos de agua sobre ambas variables, en lugar de una consecuencia directa de diferencias morfológicas en las ranas más grandes (por ejemplo una piel más gruesa). Otra opción es que en los cuerpos de agua permanentes exista una variación ontogénica de color que no esté previamente descrita en *R. temporaria* ligada a poblaciones más antiguas, sin embargo la diferenciación temprana de los morfotipos de color y la presencia de ranas de diferente tamaño con todos los tipos de color provocan que esta posibilidad sea poco probable. Por tanto, se sugiere que las diferencias observadas en la presencia y variedad de tipos de piel entre los cuerpos de agua temporales y permanentes se deben a que existe una relación entre los fenotipos de los tipos de piel 4 y 5 (y 3 en menor medida), que son menos comunes o están completamente ausentes en las ranas que experimentan una metamorfosis temprana y un tamaño pequeño (Figura 21 C). Hasta donde se sabe, la presente investigación en anuros es el primer informe acerca de un descenso tan drástico en la variabilidad fenotípica de los adultos en respuesta a las presiones ambientales en la etapa larvaria. Estos resultados son particularmente significativos debido a que la característica estudiada no tiene una relación directa con la historia de vida como pueden ser otros rasgos como el tamaño juvenil.

Si la adaptación a la reproducción en cuerpos de agua temporales puede reducir la diversidad fenotípica en múltiples aspectos, también puede tener consecuencias significativas para la conservación y la viabilidad de las poblaciones. Además, debido a que el color de la piel está determinado en gran medida por la estructura de la piel, así como la cantidad y distribución de los diferentes cromatóforos, es muy probable que exista un vínculo entre la diversidad genotípica y la diversidad del color de la piel, como también lo sugieren las diferencias geográficas en la distribución del tipo de piel encontradas en este estudio. Sin embargo, es imposible determinar de manera inequívoca la presencia y el alcance de este vínculo, siendo objeto de análisis en futuros estudios. Debido a la

importancia de la diversidad fenotípica y genotípica para la persistencia de las poblaciones en declive y la resistencia en contra de especies invasoras y patógenos (Forsman, 2014), que representan amenazas significativas para las poblaciones de anuros (Knapp y Matthews, 2000; Bosch et al., 2007) resulta de gran importancia la resolución de este vínculo. Por lo tanto, los factores que afectan la disponibilidad de cuerpos de agua permanentes seguros, como la introducción de peces no nativos con fines recreativos o el aumento de las temperaturas como consecuencia de cambio climático, tendrán un impacto directo en la capacidad de la *R. temporaria* y otros anuros para hacer frente a futuros cambios ambientales y reducirán la viabilidad de poblaciones vulnerables.

6. Conclusiones

En conclusión, este trabajo muestra que la distribución de los diferentes colores de piel en las poblaciones de *R. temporaria* no es un factor aleatorio que pueda variar con la geografía y las condiciones ambientales. Las diferencias encontradas entre los cuerpos de agua permanentes y temporales sugieren que la distribución del color de la piel es un indicador idóneo para estudiar la variabilidad fenotípica, y la variación encontrada entre las áreas geográficas sugiere que existe un vínculo con la variabilidad genética que requiere de un mayor estudio.

El método presentado en este artículo permite una medida objetiva del color de la piel de las ranas y el análisis subsiguiente de la distribución del color de la piel dentro y entre las poblaciones. Este método es fácil de llevar a cabo en el campo junto con otro tipo de muestreo de datos y puede proporcionar información sobre la diversidad fenotípica, por lo tanto resulta una herramienta valiosa para la monitorización relacionada con la conservación de *R. temporaria* y otros anuros.

Capítulo IV. Patrón Dorsal de Manchas Oscuras en *R. temporaria*

1. Resumen

El objetivo de este estudio es describir el grado de melanismo del patrón dorsal de manchas oscuras de la *R. temporaria*. Esta investigación resuelve si la variación de estos patrones depende de variables ambientales, del tamaño de la rana, o si se debe exclusivamente a un mecanismo de camuflaje. Para realizar esta investigación se realizaron fotografías digitales a 372 individuos de *R. temporaria* pertenecientes a diferentes poblaciones en alta montaña del Pirineo Central (vertiente ibérica) a altitudes entre 1500 y 2450 m s. n. m. que habitan en dos tipos de ambientes con diferente régimen de temperaturas, lagos glaciares de aguas cálidas y arroyos de aguas frías. Durante el muestreo se registraron propiedades del ambiente como la altitud, la temperatura y la temporalidad de los cuerpos de agua.

Este trabajo establece que el grado de melanismo, la temporalidad de los cuerpos de agua y el tamaño de los individuos están correlacionados. La variación en el grado de melanismo de las poblaciones está vinculada a la temperatura del agua en los diferentes ambientes donde habitan las poblaciones alpinas de la *R. temporaria*. Se concluye que el grado de melanismo del patrón dorsal de manchas oscuras en las poblaciones alpinas *R. temporaria* funciona principalmente como un mecanismo de termorregulación y favorece el camuflaje.

Palabras Clave. Melanismo, Cuerpo de agua temporal, Lagos glaciares, Mimetismo, Termorregulación

2. Introducción

El polimorfismo de color y el patrón dorsal están muy extendidos entre los anfibios anuros y reflejan la variabilidad fenotípica de estos animales (Hoffman y Blouin, 2000; Miramontes-Sequeiros et al., 2018a). Los melanóforos son células pigmentarias portadoras de melanina, que dependiendo de su localización en la piel generan dos mecanismos de color. Los melanóforos localizados en la epidermis, depositan una cantidad variable de melanina citocrina en las células epidérmicas adyacentes, dando lugar a la formación de patrones dorsales de manchas oscuras (Bagnara y Matsumoto, 2006). Los melanóforos que se localizan en la dermis contribuyen junto a otros cromatóforos al color de la piel, como se describe en nuestro artículo sobre la variabilidad fenotípica de *R. temporaria* (Miramontes-Sequeiros et al., 2018a).

La rana común europea, *R. temporaria*, es la especie de anfibio más extendida en Europa (Sillero et al., 2014). El límite meridional de su distribución en latitud y altitud se localiza en la vertiente sur del Pirineo Central, que es el hábitat de las poblaciones objetivo de estudio. En este trabajo se investiga la posible relación entre diferentes variables ambientales y específicas de la especie, y la variación en la distribución de las manchas oscuras que forman el patrón dorsal de la piel de la *R. temporaria* alpina.

Estos anfibios pueden cambiar el patrón dorsal de manchas oscuras modificando el número de cromatóforos y la cantidad de pigmento en respuesta a un estímulo persistente, como la exposición a un fondo claro u oscuro durante períodos prolongados (por ejemplo, varias semanas o una estación). Estos cambios son morfológicos, lentos y se pueden revertir (Dawes, 1941a, 1941b; Parker, 1948; Hadley y Quevedo, 1966; Bagnara et al., 1968; Fernandez y Bagnara, 1991; Bagnara y Matsumoto, 2006).

La temperatura ambiental es otro factor que estimula cambios en el grado de pigmentación oscura o melanismo. El patrón de manchas oscuras de la piel dorsal aumenta con las bajas temperaturas invernales (5° C) en *L. chiricahuensis* y en *X. laevis* independientemente de la iluminación ambiental (Fernandez y Bagnara, 1991; Roubos et al.

2010). Sin embargo, la *R. temporaria* especie objetivo del presente estudio, permanece hibernando bajo la nieve durante el periodo de temperaturas más bajas (de octubre a mayo). Además, los individuos con patrones melánicos alcanzan temperaturas más elevadas cuando se exponen experimentalmente al sol. Esto es ventajoso en condiciones de baja temperatura, pero depende del comportamiento del individuo y de su exposición a la radiación (Vences et al., 2002; Clusella-Trullas et al., 2007).

El grado de melanismo está correlacionado con las clinas de latitud. Cuando la latitud aumenta en 1500 km o más, las poblaciones de *R. temporaria* cambian el patrón de manchas melánicas como resultado de una plasticidad fenotípica inducida por el ambiente (Alho et al., 2010). La variación del patrón melánico también refleja la diferencia de edad de los individuos como resultado de un cambio ontogénico (Riobo et al., 1999; Alho et al., 2010), lo que también se ha observado en *L. septentrionalis* (Kramek y Stewart, 1980).

El polimorfismo del color resultado de diferentes grados de melanismo actúa como mecanismo de camuflaje evitando la detección por parte de los depredadores (Kramek y Stewart, 1980; Rudh y Qvarnstrom, 2013; Rabbani et al., 2015).

El objetivo de este estudio es describir la variabilidad en el grado de melanismo del patrón dorsal de manchas oscuras de *R. temporaria* y averiguar si está relacionada con alguna variable ambiental, el tamaño o si es exclusivamente un mecanismo de camuflaje.

3. Material y Métodos

3.1 Animales y Muestreo

El área de estudio se localiza en el límite sur del Pirineo Central (vertiente ibérica) a una altitud comprendida entre 1500 a 2450 m s. n. m., a una latitud que varía entre 42° 46' N y 42° 50' (equivalente a una distancia entre localidades de 7 km aproximadamente) y a una longitud que oscila entre 0° 13' W y 0° 37' W (equivalente a una distancia máxima entre las

localidades de 45 km aproximadamente). Se muestrearon 30 localidades diferentes (véase Tabla 7 en Apéndice 2) donde se fotografiaron *in situ* de 372 ejemplares de *R. temporaria*.

Los muestreos se realizaron durante 15 días, desde el 20 de julio al 5 de agosto de 2014, evitando la detección de posibles cambios morfológicos estacionales y los patrones de coloración específicos de los periodos de reproducción. Los individuos adultos de *R. temporaria* modifican sus colores durante la época de apareamiento (Bell y Zamudio, 2012) y, según la altitud del área de estudio, este periodo tiene lugar entre marzo y abril (altitud media 1600 m s. n. m.) y entre mayo y junio (altitud media 2400 m s. n. m.). La mayoría de los individuos de pequeño tamaño muestreados para este estudio se localizaron en las proximidades de charcas y humedales, mientras que los individuos de mayor tamaño fueron capturados más alejados de los cuerpos de agua.

Se estudiaron dos tipos ambientes, cuerpos de agua permanentes y temporales (Figura 22). Los cuerpos de agua permanentes son grandes lagos originados por el deshielo de los glaciares que reciben continuas entradas de agua de nieve y se mantienen con agua durante todo el año (Miramontes-Sequeiros et al., 2018a). Durante el verano, el deshielo y los parches de nieve originan fuentes de agua que forman pequeñas charcas temporales y arroyos que las ranas utilizan como zonas de cría (Miramontes-Sequeiros et al., 2018b). Se registró la temperatura atmosférica y la temperatura dentro del agua en dos ubicaciones fijas correspondientes a los dos tipos de ambientes. En cada localidad se colocaron entre cinco y diez dispositivos tipo “Datalogger iButton” que recopilaban datos durante un periodo de seis años (Figura 3). Con estos datos se calculó para cada ambiente la temperatura ambiental o T_{max} (temperatura atmosférica máxima media diaria durante el mes de agosto) y la temperatura del agua o T_w (temperatura media mensual dentro del cuerpo de agua durante el mes de agosto). En los cuerpos de agua permanentes se estudiaron las condiciones de temperatura durante el ciclo vital de las ranas durante un periodo de seis años (Figura 23).

Se midió la radiación ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) en las diferentes localidades utilizando un medidor de luz UV portátil Faginey UV 340B con una sensibilidad 290 a 390 nm.

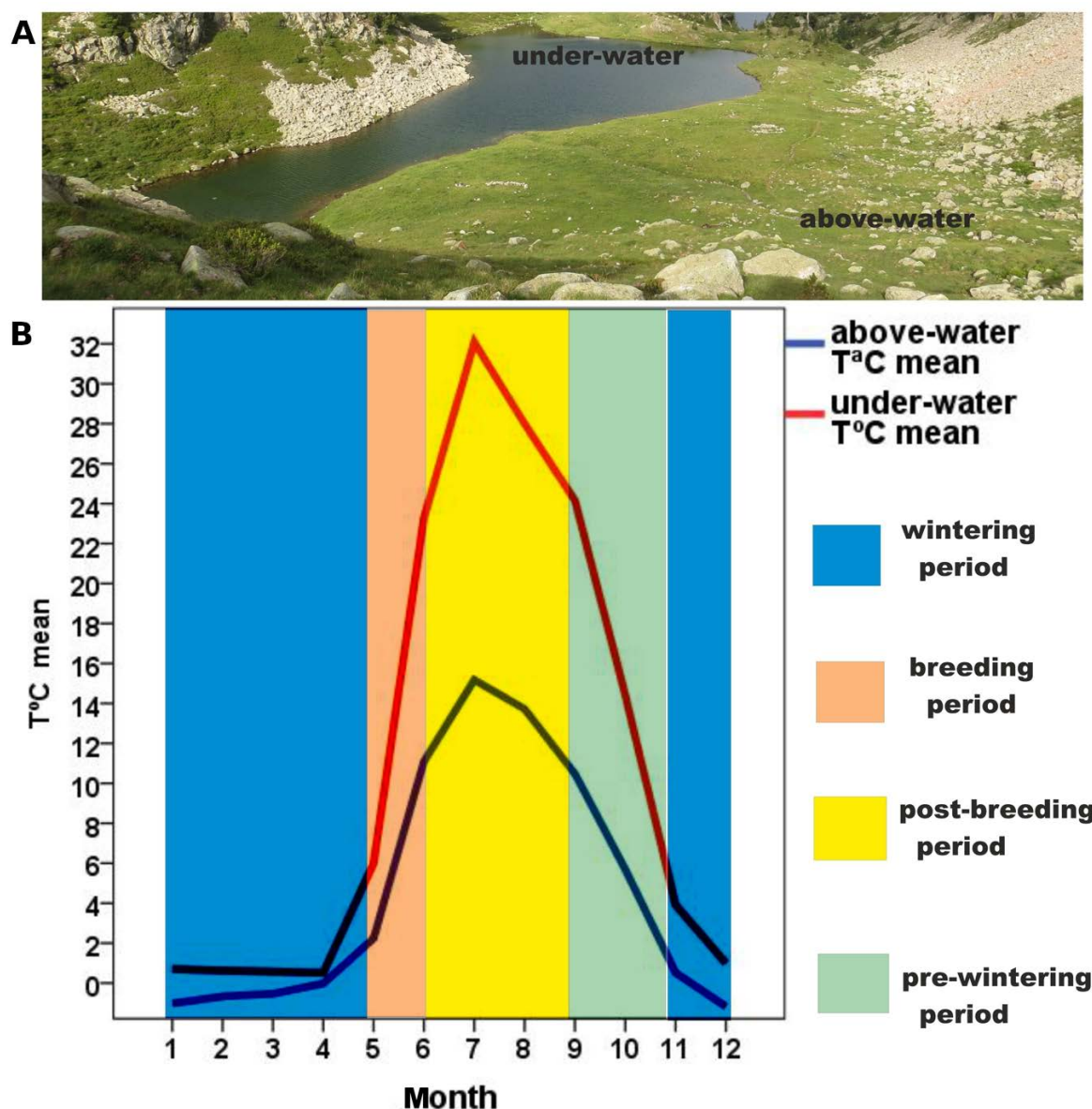


Figura 23 Condiciones de temperatura en los cuerpos de agua permanentes. A) Fotografía del Ibón de las ranas y detalle de la ubicación de los dispositivos de registro de temperatura, bajo el agua y fuera del agua. B) Gráfico de las temperaturas medias mensuales en relación al ciclo vital de las ranas en los cuerpos de agua permanentes durante un periodo de seis años. La curva azul representa la temperatura media mensual ambiental y la curva roja es la temperatura media mensual bajo el agua.

3.2 Obtención de imágenes digitales

Los individuos fueron capturados con una red fina y procesados en tandas de 10 - 20 individuos. Debido a que se conoce que los niveles de humedad influyen en la coloración de *R. temporaria* (Rowlands, 1952), los animales capturados se mantuvieron constantemente húmedos durante 30 - 60 min en una bolsa fina de tela. A continuación, se fotografiaron sobre una cuadrícula blanca portátil (para el ajuste de escala) con una cámara digital Canon PowerShot SX260 HS. Todas las fotografías se realizaron entre las 12:00 y las 14:00 a plena luz solar en días sin nubosidad. La cámara fue ajustada al modo de exposición automática en todas las imágenes para minimizar el efecto de las posibles diferencias en la iluminación ambiental. En cada espécimen se midió la SVL (cm). Una vez fotografiados, los animales fueron liberados inmediatamente sin más manipulación.

3.3 Proceso de imágenes

El análisis y proceso de las imágenes digitales se realizó con el programa GIMP 2.10.20 Open Source Image Editor, utilizando el modelo de color RGB. En primer lugar, se definió la superficie de análisis recortando minuciosamente el área de la imagen correspondiente a la superficie dorsal de la rana excluyendo las extremidades, y se anotó el número de píxeles RGB totales correspondientes al área seleccionada (N_T). En segundo lugar, se definió el color de las manchas melánicas seleccionando el color negro y ajustando el umbral B/N de la capa seleccionada al mismo valor en todas las imágenes, y se anotó el número de píxeles negros (N_B) correspondientes al área melánica (Figura 24). A continuación se calculó el grado de melanismo (C) expresado como la proporción de superficie de piel cubierta por manchas melánicas respecto al área total de piel dorsal, mediante la siguiente ecuación $[C (\%) = 100(N_B / N_T)]$.

3.4 *Análisis Estadístico*

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico IBM SPSS, versión 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) para Windows. Se estudió la variación del grado de melanismo y la relación entre el grado de melanismo y las diferentes variables registradas durante el muestreo. Las variables seleccionadas en este estudio fueron el tamaño de la rana (SVL) y variables ambientales como la altitud, la latitud, la longitud, la insolación y la temporalidad de los cuerpos de agua. En esta sección se explican los resultados más relevantes, para consultar en análisis estadístico completo véase el Apéndice 2.

Para determinar el tipo de distribución de las variables se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Este análisis reveló que todas las variables analizadas tienen un valor crítico p menor que 0,05, siendo para el grado de melanismo ($p = 0,003$), por lo que los datos no tienen una distribución normal. Las pruebas paramétricas suponen una distribución normal de los datos, por ello el análisis estadístico se continuó realizando pruebas no paramétricas.

Las variables se dividieron en categorías definiendo intervalos optimizados. Para ello se seleccionaron puntos de corte a partir de percentiles y se examinó visualmente la relación gráfica entre la variable estudiada y cada grupo utilizando diagramas de dispersión de puntos. A continuación se examinó qué grupos tenían una mayor significación respecto al grado de melanismo. La relación entre las diferentes variables se analizó utilizando tablas de contingencia, el nivel de significación se determinó aplicando la Chi-cuadrado de Pearson y la correlación entre las variables se midió utilizando el coeficiente de correlación Rho de Spearman. Las combinaciones discriminantes se representan en tablas y gráficos de barras.

4. *Resultados*

La comparación de las imágenes utilizando el coeficiente C reporta una gran diversidad del patrón dorsal de manchas oscuras en las 372 ranas estudiadas, esta

variabilidad fluctúa desde un valor máximo $C_A = 59,77 \%$ (Figura 24 A) hasta un valor mínimo $C_B = 0,86 \%$ (Figura 24 B).

El análisis de los intervalos optimizados utilizando procesos no paramétricos permite observar la influencia de las variables señaladas en el grado de melanismo. Esta optimización conduce a establecer $C = 19 \%$ como límite entre los dos grupos: el grupo C_L incluye a los individuos con un patrón dorsal de manchas claro debido a un bajo porcentaje de manchas oscuras $C \leq 19 \%$ y el grupo C_H incluye a los individuos con un patrón dorsal de manchas oscuro debido a un alto porcentaje de manchas oscuras $C > 19\%$. El tamaño de los individuos se clasificó en función de su SVL y se formaron tres grupos: ranas de talla pequeña ($1,50 \leq \text{SVL} \leq 2,10 \text{ cm}$), ranas de talla mediana ($2,11 \leq \text{SVL} \leq 6,00 \text{ cm}$) y ranas de talla grande ($6,01 \leq \text{SVL} \leq 9,50 \text{ cm}$) (Tabla 5, Tabla 6). El análisis de la relación del grado de melanismo con las variables insolación, longitud y altitud no generó resultados significativos, véase Tabla 8 (Apéndice 2).

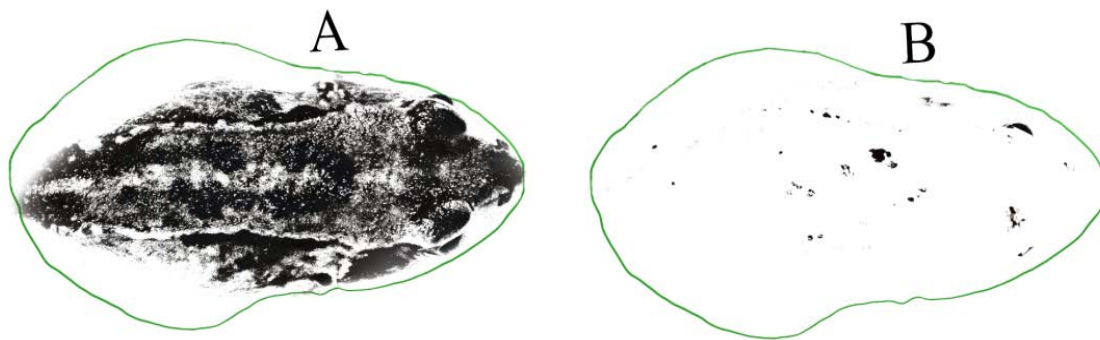


Figura 24 Patrón dorsal de manchas oscuras en *R. temporaria*. Se observa el área melánica (N_B). A) Coeficiente máximo ($C_A = 59,77 \%$). B) Coeficiente mínimo ($C_B = 0,86 \%$). C es el porcentaje de manchas oscuras calculado mediante la siguiente ecuación [$C (\%) = 100(N_B / N_T)$], $N_B = \text{N}^\circ$ total de píxeles negros del área seleccionada; $N_T = \text{N}^\circ$ total de píxeles RGB del área seleccionada.

Temporalidad de los cuerpos de agua y grado de melanismo. La temporalidad de los cuerpos de agua ($\chi^2 = 10,512$; $p = 0,001$) tiene una influencia significativa en el patrón de

distribución de las manchas oscuras (Tabla 5). En los cuerpos de agua temporales hay un 17,17 % más de individuos C_H (son el 45,69 %) que en los cuerpos de agua permanentes (son el 28,52 %) (Figura 25 A).

SVL y grado de melanismo. La SVL ($\chi^2 = 15,619$; $p = 0,000$) es la variable con mayor influencia sobre el grado de melanismo de todas las variables consideradas (Tabla 5). El análisis de los datos muestra que el 48,48 % de los individuos de tamaño pequeño y el 48,00 % de tamaño grande tienen un patrón dorsal de manchas más oscuro, aumentando un 20,9 % la proporción de individuos que pertenecen al grupo C_H respecto a las ranas medianas. Asimismo las ranas medianas son el grupo con mayor proporción de individuos C_L (son el 72,66 %) (Figura 25 B).

Tabla 5 Relación entre la temporalidad de los cuerpos de agua, la SVL y el grado de melanismo en 372 individuos de *R. temporaria*. Los valores de la tabla representan las frecuencias relativas (%).

Variables	Categorías	Grado de melanismo C		Chi-cuadrado de Pearson	
		C_L	C_H	χ^2	P
Temporalidad de los cuerpos de agua (Figura 25 A)	Temporal	54,31	45,69	10,512	0,001
	Permanente	71,48	28,52		
	Total	66,13	33,87		
SVL (cm) (Figura 25 B)	1,50 - 2,10	51,52	48,48	15,619	0,000
	2,11 - 6,00	72,66	27,34		
	6,01 - 9,50	52,00	48,00		
	Total	66,13	33,87		

Nota. El grado de melanismo se dividió en dos grupos: C_L como el grupo de individuos con bajo porcentaje de manchas oscuras, $C \leq 19$ %, y C_H como el grupo de individuos con alto porcentaje de manchas oscuras, $C > 19$ %, cuyo máximo se alcanza en $C = 60$ %.

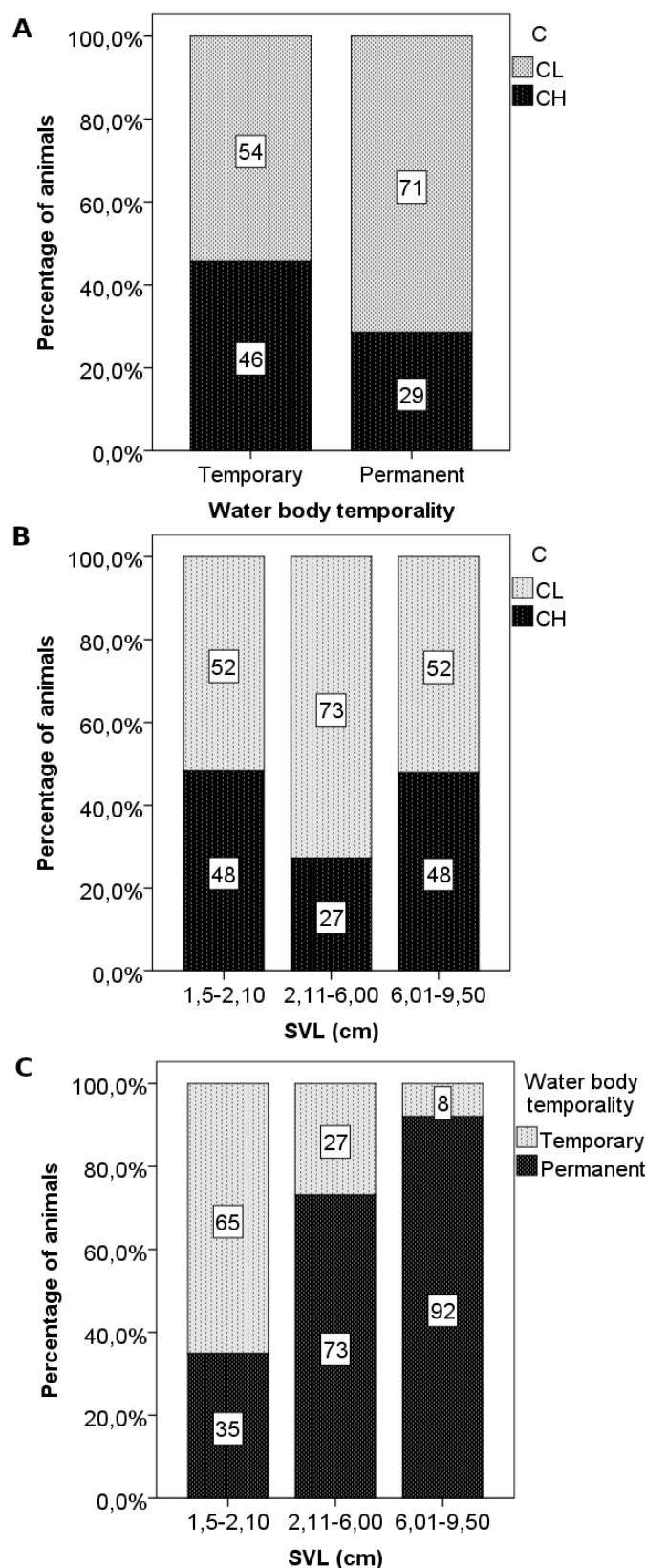


Figura 25 Relación ente el grado de melanismo y las diferentes variables. A) Porcentaje de animales con diferente grado de melanismo localizados en cuerpos de agua temporales y permanentes. B) Porcentaje de animales con diferente grado de melanismo en función de su SVL. C) Porcentaje de ranas con diferente SVL localizados en cuerpos de agua temporales o permanentes.

Tabla 6 Relación entre la temporalidad de los cuerpos de agua y la SVL en 372 individuos de *R. temporaria*. Los valores de la tabla representan las frecuencias relativas (%).

Variables	Categorías	Temporalidad de los cuerpos de agua		Chi-cuadrado de Pearson	
		Temporal	Permanente	χ^2	p
SVL (cm) (Figura 25 C)	1,50 - 2,10	65,15	34,85	50,334	0,000
	2,11 - 6,00	26,95	73,05		
	6,01 - 9,50	8,00	92,00		
	Total	31,18	68,82		

Nota. La SVL se dividió en categorías según intervalos optimizados.

Temporalidad de los cuerpos de agua y SVL. La temporalidad de los cuerpos de agua ($\chi^2=50,334$; $p = 0,000$) afecta de manera significativa a la SVL (Tabla 6) observándose diferente distribución de tamaños de rana dependiendo del tipo de cuerpo de agua. El 65,15 %, de las ranas de pequeño tamaño, el 26,95 % de las ranas de tamaño mediano y el 8,00 % de las ranas de tamaño grande se encuentran en cuerpos de agua temporales (Figura 25 C), el resto de los individuos de todos los tamaños se localizan en cuerpos de agua permanentes.

Teniendo en cuenta las correlaciones bivariadas no paramétricas entre las variables consideradas, la SVL y la temporalidad de los cuerpos de agua son las que tienen una mayor correlación Rho de Spearman ($\rho = 0,356$, $p = 0,000$). El resto de las variables analizadas, o bien muestran una correlación muy baja o ésta no es significativa (véase Apéndice 2).

El análisis de las condiciones de temperatura de los diferentes cuerpos de agua, reveló que el lugar de muestreo está relacionado con la temperatura atmosférica y la temperatura dentro del agua. Los ambientes de alrededor de los lagos glaciares son hábitats más fríos, con una $T_{\max} = 17,3^\circ \text{C}$ y tienen aguas más cálidas $T_w = 28,2^\circ \text{C}$, mientras los ambientes de alrededor de las fuentes y arroyos son hábitats templados con una $T_{\max} = 21,8^\circ \text{C}$ y aguas más frías $T_w = 12,1^\circ \text{C}$. Por lo tanto, las condiciones de temperatura

ambiental y de temperatura dentro del agua son diferentes en los cuerpos de agua temporales y permanentes.

5. Discusión

El grado de melanismo no muestra diferencias significativas al considerar variables ambientales como la altitud, la longitud y la latitud. Se ha reportado que la altitud no modifica el grado de melanismo (Alho et al., 2010). La distancia máxima latitudinal entre los lugares de muestreo en esta investigación es pequeña, 7 km aproximadamente, sin embargo cuando la variación en latitud es grande, 1500 km o más, el patrón dorsal de manchas oscuras sufre modificaciones (Alho et al., 2010).

El grado de melanismo muestra diferencias significativas en relación a la temporalidad de los cuerpos de agua. En los cuerpos de agua temporales hay un 17,17 % más de individuos con un patrón dorsal de manchas oscuro ($C_H = 45,69 \%$) respecto a los cuerpos de agua permanentes ($C_H = 28,52 \%$) (Figura 25 A). Para analizar el efecto de la temporalidad de los cuerpos de agua sobre el grado de melanismo, es importante tener en cuenta que la temporalidad está correlacionada con otros factores como son el sustrato, la temperatura atmosférica y la temperatura dentro del agua.

Estos cuerpos de agua temporales al desecarse muestran un sustrato oscuro (Figura 22). La exposición del animal durante un periodo prolongado a un entorno oscuro induce la formación de manchas oscuras y el oscurecimiento del individuo (Dawes, 1941a, Parker, 1948; Hadley y Quevedo, 1966; Fernandez y Bagnara, 1991; Bagnara y Matsumoto, 2006). Los individuos que tienen un patrón dorsal de manchas oscuro y se localizan en cuerpos de agua temporales pueden camuflarse con el ambiente, por lo tanto un mayor grado de melanismo en el patrón dorsal de la *R. temporaria* es ventajoso para el animal, como ocurre en *L. septentrionalis* (Kramek y Stewart, 1980) y en el sapo *A. fowleri* (Rabbani et al., 2015).

La temperatura está correlacionada con la temporalidad de los cuerpos de agua. Teniendo en cuenta que las bajas temperaturas invernales, 5° C, inducen un aumento en el grado de melanismo independientemente de la iluminación ambiental (Fernandez y Bagnara, 1991; Roubos et al. 2010), es importante considerar que las poblaciones de *R. temporaria* que habitan en el Pirineo Central hibernan bajo la nieve durante el periodo de bajas temperaturas. El periodo invernal depende de la altitud, en los cuerpos de agua temporales (altitud media 1600 m s. n. m.), la temperatura atmosférica es más suave y la hibernación se extiende desde noviembre hasta marzo, mientras que en los lagos glaciares (altitud media 2400 m s. n. m.), la temperatura atmosférica es más fría, se acumula mayor cantidad de nieve que a menores altitudes y el periodo de hibernación se amplía durante dos meses más (hasta finales de mayo). Con la llegada de la primavera aumentan las temperaturas, se inicia el deshielo, aparecen las primeras floraciones y comienza el periodo de reproducción en ambos ambientes.

Durante el mes de agosto (periodo de muestreo), la temperatura media atmosférica máxima de los cuerpos de agua temporales ($T_{\max} = 21,8^{\circ}\text{C}$) es más alta que en el entorno de los cuerpos de agua permanentes ($T_{\max} = 17,3^{\circ}\text{C}$), siendo la diferencia entre la temperatura máxima en ambos ambientes igual a $4,5^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, el agua de las fuentes y arroyos es más fría ($T_w = 12,1^{\circ}\text{C}$) que el agua de los lagos glaciares ($T_w = 28,2^{\circ}\text{C}$), siendo la diferencia media registrada entre ambos ambientes igual a $16,1^{\circ}\text{C}$. En los lagos glaciares la temperatura dentro del agua y la temperatura atmosférica tienen una tendencia similar (Figura 23), sin embargo la tasa de la temperatura dentro del agua es mucho mayor que la temperatura del aire terrestre, lo que demuestra que los lagos glaciares del Pirineo Central se están calentando más rápido que su entorno, tal y como afirman otros autores en estudios realizados en lagos septentrionales (Austin y Colman, 2007) y numerosos lagos alpinos (Riffler et al., 2015). En los cuerpos de agua temporales, el agua fluye bajo la tierra y aflora a la superficie a través de fuentes formando arroyos y charcas que reciben aportes de agua de lluvia y nieve, siendo la temperatura del agua de los cuerpos de agua temporales más baja que la temperatura de los lagos. Este incremento de

la temperatura en los lagos glaciares respecto a los arroyos temporales coincide con las descripciones de Robinson y Oertli (2009).

Los cuerpos de agua temporales tienen un 17,17 % más de individuos con un patrón dorsal de manchas oscuro ($C_H = 45,69$ %) y aguas más frías ($T_w = 12,1^\circ \text{C}$) que las aguas cálidas ($T_w = 28,2^\circ \text{C}$) de los cuerpos de agua permanentes ($C_H = 28,52$ %). Se ha demostrado previamente que los individuos con un patrón dorsal de manchas oscuro incrementan su temperatura corporal más rápidamente que los individuos con un patrón dorsal de manchas claro (Vences et al., 2002; Clusella-Trullas et al., 2007), por lo tanto un mayor grado de melanismo favorece el incremento de la temperatura corporal frente a las bajas temperaturas dentro del agua de los cuerpos de agua temporales y un menor grado de melanismo es ventajoso en los cuerpos de agua permanentes (aguas calientes). Por ello se deduce que el grado de melanismo del patrón dorsal de manchas oscuras proporciona a las poblaciones alpinas *R. temporaria* un mecanismo de termorregulación y de mimetismo inducido por el ambiente.

La distribución por tamaños cambia según la temporalidad de los cuerpos de agua (Figura 25 C), las ranas pequeñas predominan en los cuerpos de agua temporales (son el 65,15 %) y conforme aumentan de tamaño se incrementa la proporción de individuos con mayor SVL en los cuerpos de agua permanentes, donde las ranas medianas alcanzan el 73,05 % y las grandes representan el 92,00 %. Las ranas adultas utilizan las charcas y arroyos formados durante el deshielo en verano para reproducirse (Miramontes-Sequeiros et al., 2018b), por lo que la migración de las ranas de mayor tamaño a estos cuerpos de agua temporales durante la época de reproducción explica el incremento de individuos de pequeño tamaño en este ambiente.

Las ranas pequeñas y grandes presentan el mismo grado de melanismo ($C_H = 48$ %) y sin embargo tienen diferente distribución según la temporalidad de los cuerpos de agua. Por otro lado, las ranas medianas tienen diferente grado de melanismo respecto a las pequeñas y grandes (Figura 25 B), predomina un patrón dorsal más claro ($C_L = 72,66$ %), y

al igual que las ranas grandes se encuentran en los cuerpos de agua permanentes (son el 73,05 %). La diferente distribución de las ranas pequeñas y grandes con el mismo grado de melanismo en diferentes cuerpos de agua puede ser debido a que durante la época de reproducción, que tiene lugar entre marzo y abril (altitud media 1600 m s. n. m.) y entre mayo y junio (altitud media 2400 m s. n. m.), las ranas adultas se encuentran en los cuerpos de agua temporales (Miramontes-Sequeiros et al., 2018b). En este periodo los individuos adultos pueden modificar su patrón dorsal para adaptarse al ambiente oscuro (Dawes, 1941a, Parker, 1948; Hadley y Quevedo, 1966; Fernandez y Bagnara, 1991; Bagnara y Matsumoto, 2006) y mimetizarse con el ambiente (Kramek y Stewart, 1980; Rabbani et al., 2015), pudiendo mantener el patrón oscuro durante toda la estación (Dawes, 1941a, Parker, 1948; Bagnara y Matsumoto, 2006). Una vez finalizada la época de reproducción, periodo durante el cual se realizó este estudio, las ranas adultas migran a los cuerpos de agua permanentes en búsqueda de presas. Las ranas medianas no abandonan los cuerpos de agua permanentes por lo que no adaptan su patrón dorsal a otros ambientes. Además estos patrones oscuros en ranas grandes podrían ser beneficiosos a grandes altitudes donde se observan depredadores como los cuervos (*Corvus corax*), armiños (*Mustela erminea*), víboras (*Vipera aspis*) y culebras de agua (*Natrix natrix* y *Natrix maura*) que dependen en gran medida de estos anfibios, por lo que el patrón de manchas oscuras puede utilizarse como mecanismo de camuflaje en toda el área de estudio, principalmente en espacios abiertos de gran altitud (dominio alpino).

6. Conclusiones

Este estudio demuestra que el grado de melanismo del patrón dorsal de la *R. temporaria* varía con el tamaño de los individuos y con factores ambientales como la temporalidad de los cuerpos de agua.

Las ranas pequeñas tienen una mayor proporción de individuos con un patrón dorsal oscuro y predominan en los cuerpos de agua temporales. El sustrato oscuro de estos ambientes induce el oscurecimiento del patrón dorsal de manchas que favorece el mimetismo con el ambiente, además un mayor grado de melanismo en el patrón dorsal produce un incremento de la temperatura corporal que resulta beneficioso dentro de las frías aguas de los arroyos ($T_w = 12,1^\circ \text{C}$). Las ranas pequeñas permanecen en estos ambientes que están rodeados de una densa vegetación y les proporciona un entorno húmedo y protector.

Las ranas grandes generalmente se reproducen en los cuerpos de agua temporales, durante el periodo de apareamiento el sustrato oscuro de estos ambientes induce la formación de un patrón dorsal de manchas oscuro que favorece el mimetismo y la termorregulación en aguas frías. Cuando finaliza la época de reproducción las ranas adultas migran en búsqueda de alimento a los cuerpos de agua permanentes donde se establecen durante el resto de la estación. Los cambios en el patrón dorsal de manchas, son lentos y morfológicos, por lo que la adaptación al ambiente durante la época de cría podría mantenerse durante toda la estación pudiendo ser ventajoso en la evitación de depredadores en los ambientes alpinos.

Las ranas de tamaño medio no abandonan los cuerpos de agua permanentes conservando un patrón dorsal de manchas más claro, la temperatura dentro del agua es más cálida que en los cuerpos de agua temporales y que la temperatura ambiental. Un menor grado de melanismo en el patrón dorsal de manchas mantiene la temperatura corporal evitando el sobrecalentamiento dentro de las cálidas aguas de los lagos glaciares.

Por lo tanto, se concluye que el grado de melanismo del patrón dorsal de manchas oscuras proporciona a las poblaciones alpinas *R. temporaria* un mecanismo de termorregulación y de mimetismo inducido por el ambiente.

Discusión

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar la biogeografía de las poblaciones de la rana bermeja (*R. temporaria*) en el Pirineo Central aragonés, los factores que afectan a su distribución y los mecanismos específicos de adaptación al ambiente. Para analizar la diversidad fenotípica de las poblaciones de la rana bermeja, se estudiaron el polimorfismo del color de la piel y del patrón dorsal de manchas de los individuos, así como la morfología de la piel y los factores que determinan su coloración.

Los factores ambientales como la altitud y el tipo de cuerpo de agua determinan la duración de las fases del ciclo biológico de las poblaciones de la rana bermeja alpina. Así pues, en las áreas localizadas a mayor altitud (altitud media de 2400 m s. n. m.), se produce una mayor acumulación de hielo y nieve que aumenta en 75 días aproximadamente la duración del periodo de hibernación y retrasa el inicio de la época de reproducción respecto a altitudes más bajas (altitud media de 1600 m s. n. m.). Se ha reportado que la variación estacional a lo largo de gradientes geográficos es un factor importante que influye en la duración de las fases del ciclo vital de los anfibios (Hjernquist et al., 2012). Debido a que el gradiente altitudinal y el tipo de cuerpo de agua están relacionados con la estacionalidad, se puede concluir que ambos factores afectan a la duración de las fases del ciclo biológico de la rana bermeja alpina y por lo tanto influyen en la distribución geográfica de las poblaciones.

Los resultados de esta investigación demuestran que la variabilidad fenotípica del color de la piel y la variabilidad del grado de melanismo del patrón dorsal de manchas en las poblaciones de *R. temporaria* en el Pirineo Central aragonés no son factores que cambian aleatoriamente con la geografía y las condiciones ambientales. El principal factor que influye en la distribución de estas poblaciones alpinas es la temporalidad de los cuerpos de agua, que afecta significativamente a la distribución y a la variabilidad de los tipos de piel, al grado de melanismo del patrón dorsal y a la distribución por tamaños. En los cuerpos de agua

temporales los individuos tienen menor diversidad fenotípica en el color de la piel, tienen un mayor grado de melanismo en el patrón dorsal de manchas y desarrollan un menor tamaño que los individuos que se encuentran en los cuerpos de agua permanentes. Esta diferencia de tamaño y menor diversidad fenotípica en el color entre ambos ambientes es acorde con una metamorfosis temprana de los renacuajos como respuesta a la desecación del hábitat (Newman, 1989; Lind y Johansson, 2007), lo cual tiene efectos negativos en el tamaño y la diversidad fenotípica de los adultos.

Los cuerpos de agua temporales son ambientes de aguas frías, que las ranas adultas generalmente utilizan para reproducirse (Miramontes-Sequeiros et al., 2018b). Estos ambientes de sustrato oscuro inducen un cambio de color morfológico (Dawes, 1941 a, b; Bagnara y Matsumoto, 2006) que aumenta el grado de melanismo del patrón dorsal en las ranas grandes durante la época de reproducción y en las ranas pequeñas que nacen allí. Los patrones dorsales oscuros, según Vences et al. (2002) y Clusella-Trullas et al. (2007) favorecen el incremento de la temperatura corporal, proporcionando a las poblaciones un mecanismo de termorregulación frente a las bajas temperaturas dentro del agua que caracteriza estos ambientes. Teniendo en cuenta que las ranas grandes tienen mayor densidad de iridóforos en la piel dorsal que las ranas pequeñas, pero que ambos tamaños presentan patrones dorsales oscuros con un grado de melanismo similar, una mayor densidad de iridóforos puede proporcionar a las ranas grandes un mecanismo para evitar la EWL y un mecanismo de fotoprotección frente a la radiación UV permitiendo que los individuos de mayor tamaño se alejen de los humedales en búsqueda de presas y migren a los cuerpos de agua permanentes. Por otro lado, las ranas pequeñas no se alejan de los cuerpos de agua temporales, estas charcas y humedales están rodeados de densa vegetación que proporciona un ambiente húmedo y protector a las ranas pequeñas y les permite mantener un menor número de iridóforos en relación a las ranas de mayor tamaño.

Los cuerpos de agua permanentes son ambientes de aguas cálidas, localizados a mayor altitud, menor humedad relativa y con mayor exposición a la radiación UV. En el caso

de las ranas medianas, un patrón dorsal de manchas claro en combinación con una densidad de iridóforos alta implica un aumento en la reflexión de la radiación solar a través de los iridóforos, disminuyendo la EWL (Tracy 1976; Tattersall et al. 2006) y favoreciendo el efecto fotoprotector de los iridóforos frente a la radiación UV cuando los individuos se alejan de los cuerpos de agua, además evita el sobrecalentamiento dentro de las cálidas aguas de los lagos glaciares regulando la temperatura corporal. Por lo tanto se concluye que la presencia de un elevado número de iridóforos junto a su capacidad de reflejar la radiación UV representa un mecanismo específico de termorregulación que actúa como fotoprotector frente a la dañina radiación UV, evita el sobrecalentamiento de la piel y la EWL. Teniendo en cuenta que los patrones dorsales de manchas oscuras en anfibios tienen una función mimética (Kramek y Stewart, 1980; Rudh y Qvarnstrom, 2013; Rabbani et al., 2015), que los individuos con patrones melánicos alcanzan temperaturas más elevadas cuando se exponen a la radiación solar (Vences et al., 2002; Clusella-Trullas et al., 2007) y que el grado de melanismo se debe a fenómenos de plasticidad fenotípica que no están relacionados con variables ambientales como la altitud (Alho et al., 2010), se sugiere que existe un equilibrio entre la EWL y el mimetismo que limita la variabilidad en el grado de melanismo y que estos patrones están limitados por la humedad relativa baja y la radiación UV. Por tanto, se puede afirmar que el aumento en la densidad de los iridóforos y los factores ambientales que conducen a una menor humedad relativa del ambiente están relacionados, por lo que se concluye que los iridóforos son un mecanismo de protección frente a la EWL.

Por otro lado, se observa que la diversidad fenotípica y el grado de melanismo están ambos relacionados con la temporalidad de los cuerpos de agua, considerando que diversos estudios han sugerido que la temporalidad de los cuerpos de agua es un factor ambiental que configura la estructura genética de las poblaciones debido a que tienen afrontar esta compensación (Palo et al., 2003; Lind et al., 2011; Lind y Johansson, 2011), es muy probable que exista un vínculo entre la diversidad genotípica y la diversidad del color de la piel.

Se han realizado diferentes estudios acerca de los genes que participan en la melanización de vertebrados. Se conoce que el gen receptor de melanocortina 1 (Mc1r) induce la melanización en vertebrados (Bagnara y Matsumoto, 2006; Rudh et al., 2013), sin embargo el gen Mc1r no explica las diferencias encontradas en el grado de melanismo de la *R. temporaria* (Alho et al., 2010; Herczeg et al., 2010; Matsuba, 2012). En anfibios la piel ventral generalmente tiene una apariencia más clara que la piel dorsal debido a la expresión de un factor inhibidor de la melanización (MIF) que suprime la melanización y estimula la expresión de los iridóforos (Fukuzawa y Ide, 1988; Fukuzawa y Bagnara, 1989; Fukuzawa et al., 1995; Rudh et al., 2013). En la piel dorsal, el patrón dorsal de manchas está regulado por la hormona estimulante de los melanóforos (MSH) y no se expresa el factor MIF (Fukuzawa et al., 1995). En aves y mamíferos, cuando se expresa el gen Agouti, este codifica una proteína que interacciona con el gen Mc1r e inhibe la melanización en los melanocitos de mamíferos de forma similar a MIF en anfibios, y mantiene los patrones de pigmentación dorsoventrales (Nadeau et al., 2008; Bagnara y Matsumoto, 2006; Rudh et al., 2013). Por lo tanto, no se ha demostrado que el gen Mcr1 en anfibios regule el patrón de pigmentación (Herczeg et al., 2010; Alho et al., 2010; Matsuba, 2012), a diferencia de en aves y mamíferos (Bagnara y Matsumoto, 2006; Rudh et al., 2013).

Por otro lado, la formación del patrón dorsal de manchas de anfibios es similar a la formación de las manchas negras en mariquitas (*Harmonia axyridis*). El gen *pannier* regula el patrón de pigmentación de las mariquitas, la expresión de este gen por un lado induce la síntesis de melanina, que se deposita formando las manchas negras de la cutícula, y por otro inhibe la acumulación de carotenos (Ando y Miimi, 2019). De manera similar, en el caso de los anfibios, la liberación de la hormona MSH estimula la síntesis de melanina en los melanóforos de epidermis, que se deposita formando las manchas de un patrón dorsal oscuro (Dawes, 1941 a, b; Bagnara y Matsumoto, 2006), e inhibe la proliferación de los iridóforos dérmicos (Taylor, 1969; Fernandez y Collins, 1988; Fernandez y Bagnara, 1991, 1993; Bagnara y Matsumoto, 2006). En el caso de las mariquitas, las regiones donde no se

expresa el gen *pannier* carecen de melanina y se almacenan carotenos que proporcionan la característica coloración rojiza de los élitros. Mientras que en el caso de los anfibios, la ausencia de la hormona MSH produce la destrucción de la melanina de los melanóforos epidérmicos (Dawes, 1941 a, b; Bagnara y Matsumoto, 2006) y estimula la expresión de iridóforos resultando un patrón de pigmentación más claro (Taylor, 1969; Fernandez y Collins, 1988; Fernandez y Bagnara, 1991, 1993; Bagnara y Matsumoto, 2006). El estudio de la regulación y los genes implicados en la formación del patrón dorsal en ambos animales podría abordarse en futuros estudios. Con el fin de evitar el declive de los anfibios, la diversidad fenotípica y genotípica de las poblaciones son factores clave para asegurar la conservación de las especies (Forsman, 2014). Por ello sería interesante la realización de futuros estudios que analicen la relación entre la variación genotípica, la diversidad fenotípica y la distribución de las poblaciones. También se podría analizar diversidad genética entre las poblaciones y su variabilidad en relación a diferentes factores ambientales para determinar los posibles factores que afecten a su adaptación.

Conclusiones

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La abundancia de los iridóforos y su organización en varias capas de células es una adaptación morfológica del tegumento de la *R. temporaria* a las condiciones ambientales de la alta montaña.
2. La fluorescencia que emiten los iridóforos indica un mecanismo específico de fotoprotección a través de la disipación de la radiación UV. Se demuestra que el incremento en la densidad de iridóforos es un mecanismo de fotoprotección que permite a la especie adaptarse a los ambientes áridos de alta montaña o árticos situados en los límites de su distribución europea.
3. La distribución de los diferentes colores de la piel en las poblaciones de *R. temporaria* no es un factor que varía aleatoriamente con la geografía y las condiciones ambientales, sino que varía con la temporalidad de los cuerpos de agua. Se concluye que la diversidad fenotípica del color de la piel es mayor en los cuerpos de agua permanentes respecto a los cuerpos de agua temporales.
4. El método desarrollado en esta Tesis Doctoral demuestra que se puede medir el color de la piel de las ranas y dividirlo en tipos específicos, lo que permite analizar la diversidad fenotípica entre y dentro de las poblaciones. Este método no invasivo se aplica fácilmente *in situ* y proporciona una herramienta valiosa para la monitorización y conservación de poblaciones de la *R. temporaria* y otros anuros.
5. El grado de melanismo del patrón dorsal de manchas oscuras proporciona a las poblaciones alpinas *R. temporaria* principalmente un mecanismo de termorregulación.

Referencias

- Alho, J. S., Herczeg, G., Söderman, F. Laurila, A. Jönsson, K. I. y Merilä, J. (2010). Increasing melanism along a latitudinal gradient in a widespread amphibian: local adaptation, ontogenic or environmental plasticity? *BMC Evolutionary Biology*, 10, 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-317>
- Ando, T. y Niimi, T. (2019). Development and evolution of color patterns in ladybird beetles: A case study in *Harmonia axyridis*. *Ecology, Evolution and Development*, 61(1), 73-84. <https://doi.org/10.1111/dgd.12592>
- Andrew, W. (1959). A covering called skin. *Textbook of Comparative Histology* (pp. 96-135). Oxford University Press.
- Arnold, E. N. (2002). *Reptiles and Amphibians of Europe*. Princeton University Press.
- Aspengren, S., Hedberg, D. y Wallin, M. (2006). Studies of pigment transfer between *Xenopus laevis* melanophores and fibroblasts in vitro and in vivo. *Pigment Cell Research*, 19(2), 136-145. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00290.x>
- Assenza, S. P. y Brown, P. R. (1984). Ultraviolet and fluorescence characterization of purines and pyrimidines by post-column pH manipulation. *Journal of Chromatography A*, 289, 355-365. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)95101-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)95101-X)
- Austin, J. A. y Colman, S. M. (2007). Lake Superior summer water temperatures are increasing more rapidly than regional air temperatures: A positive ice-albedo feedback. *Geophysical Research Letters*, 34(6), L06604. <https://doi.org/10.1029/2006GL029021>
- Ayres, E., Nkem, J. N., Wall, D. H., Adams, B. J., Barret, J. E., Simmons, B. L., Virginia, R. A. y Fountain, A. G. (2010). Experimentally increased snow accumulation alters soil moisture and animal community structure in a polar desert. *Polar Biology*, 33, 897-907. <https://doi.org/10.1007/s00300-010-0766-3>
- Azevedo, R. A., Pelli, A. A., Ferreira-Pereira, A., de Jesus-Santana, A. S., Felsemburgh, F. y de Brito-Gitirana, L. (2005). Structural aspects of the Eberth-Katschenko layer of *Bufo*

- ictericus* integument: histochemical characterization and biochemical analysis of the cutaneous calcium (Amphibian, Bufonidae). *Micron*, 36(1), 61-65.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2004.06.004>
- Azevedo, R. A., Carvalho, H. F. y de Brito-Gitirana, L. (2007). Hyaluronan in the epidermal and the dermal extracellular matrix: Its role in cutaneous hydric balance and integrity of anuran integument. *Micron*, 38(6), 607-610.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.09.008>
- Bagnara, J. T. (1966). Cytology and cytophysiology of non-melanophore pigment cells. *International Review of Cytology*, 20, 173-205. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60801-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60801-3)
- Bagnara, J. T., Taylor, J. D. y Hadley, M. E. (1968). The dermal chromatophore unit. *Journal of Cell Biology*, 38(1), 67-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.38.1.67>
- Bagnara, J. T. y Hadley, M. E. (1973). *Chromatophores and Color Change: The Comparative Physiology of Animal Pigmentation*. Prentice-Hall.
- Bagnara, J. T. (1976). Color change. En B. Lofts (Ed.), *Physiology of the Amphibia* (Vol. 3, pp. 1-52). Academic Press.
- Bagnara, J. T. y Matsumoto, J. (2006). Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues. En J. J. Nordlund, R. E. Boissy, V. J. Hearing, R. A. King, W. S. Oetting, y J. P. Ortonne (Eds.), *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology* (2nd ed., pp. 11-59). Blackwell Publishing, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9780470987100.ch2>
- Bagnara, J. T., Fernandez, P. J. y Fujii, R. (2007). On the blue coloration of vertebrates. *Pigment Cell Research*, 20(1), 14-26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00360.x>
- Balcells, E. (1975). Observaciones en el ciclo biológico de anfibios de alta montaña y su interés en la detección del inicio de la estación vegetativa. *Publicaciones del Centro Pirenaico de Biología Experimental*, 7(2), 55-153.

- Barnosky, A. D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G. O. U., Swartz, B., Quental, T. B., Marshall, C., McGuire, J. L., Lindsey, E. L., Maguire, K. C., Mersey, B. y Ferrer, E. A. (2011). Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*, 471(7336), 51-57. <http://doi.org/10.1038/nature09678>
- Bell, R. C. y Zamudio, K. R. (2012). Sexual dichromatism in frogs: natural selection, sexual selection and unexpected diversity. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 279(1748), 4687-4693. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1609>
- Bentley, P. J. (1966). Adaptations of Amphibia to arid environments. *Science*, 152(3722), 619-623. <https://doi.org/10.1126/science.152.3722.619>
- Ben-Zvi, O., Eyal, G. y Loya, Y. (2015). Light-dependent fluorescence in the coral *Galaxea fascicularis*. *Hydrobiologia*, 759, 15-26. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2063-6>
- Blaylock, L. A., Ruibal, R. y Platt-Aloia, K. (1976). Skin structure and wiping behavior of Phyllomedusine frogs. *Copeia*, 2, 283-295. <https://doi.org/10.2307/1443948>
- Bosch, J., Carrascal, L. M., Duran, L., Walker, S. y Fisher, M. C. (2007). Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 274(1607), 253-260. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3713>
- Brown, D., Grosso, A. y De Sousa, R. C. (1981). The amphibian epidermis: distribution of mitochondria-rich cells and the effect of oxytocin. *Journal of Cell Science*, 52, 197-213.
- Centeno, F. C., Antoniazzi, M. M., Andrade, D. V., Kodama, R. T., Sciani, J. M., Pimenta, D. C. y Jared, C. (2015). Anuran skin and basking behavior: The case of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956). *Journal of Morphology*, 276(10), 1172-1182. <https://doi.org/10.1002/jmor.20407>
- Clusella-Trullas, S., van Wyk, J. H. y Spotila, J. R. (2007). Thermal melanism in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 32(5), 235-245. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.013>

- Cogălniceanu, D., Dorel, R., Plăiașu, R. y Palmer, M. W. (2018). Out in the cold: Trophic resource use by the common frog (*Rana temporaria*) populations inhabiting extreme habitats. *Annales Zoologici Fennici*, 55(4-6), 257-275. <https://doi.org/10.5735/086.055.0608>
- Collins, J. P. (2010). Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Disease of aquatic organisms*, 92, 93-99. <https://doi.org/10.3354/dao02307>
- Dawes, B. (1941a). The melanin content of the skin of *Rana temporaria* under normal conditions and after prolonged light- and dark-adaptation. A photometric study. *Journal of Experimental Biology*, 18(1), 26-49.
- Dawes, B. (1941b). Pigmentary changes and the background response in *Amphibia*. *Nature*, 147, 806-807. <https://doi.org/10.1038/147806b0>
- Denefle, J. P., Zhu, Q. L., y Lechaire, J. P. (1993). Localization of fibronectin in the frog skin. *Tissue and Cell*, 25(1), 87-102. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(93\)90066-T](https://doi.org/10.1016/0040-8166(93)90066-T)
- Drewes, R. C., Hillman, S. S., Putnam, R. W. y Sokol, O. M. (1977). Water, nitrogen and ion balance in African treefrog *Chiromantis petersi boulenger* (Anura: Rhacophoridae), with comments on the structure of the integument. *Journal of Comparative Physiology B*, 116, 257-267. <https://doi.org/10.1007/BF00689035>
- Duane, W. J., Pepin, N. C., Losleben, M. L. y Hardy, D. R. (2008). General characteristics of temperature and humidity variability on Kilimanjaro, Tanzania. *Arctic Antarctic, and Alpine Research*, 40(2), 323-334. [https://doi.org/10.1657/1523-0430\(06-127\)\[DUANE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1657/1523-0430(06-127)[DUANE]2.0.CO;2)
- Duellman, W. E. y Trueb, L. (1994). Integument. *Biology of Amphibians* (pp. 367-378). The Johns Hopkins University Press.
- Elkan, E. (1968). Mucopolysaccharides in the anuran defence against desiccation. *Journal of Zoology*, 155(1), 19-53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1968.tb03028.x>
- Els, W. J., y Henneberg, R. (1990). Histological features and histochemistry of the mucous glands in ventral skin of the frog (*Rana fuscigula*). *Histology and Histopathology*, 5(3), 343-348.

- Endler, J. A. (1990). On the measurement and classification of color in studies of animal color patterns: *Biological Journal of the Linnean Society*, 41(4), 315-352. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1990.tb00839.x>
- Enriquez-Urzelai, U., Tingley, R., Kearney, M. R., Sacco, M., Palacio, A. S., Tejedo, M. y Nicieza, A. G. (2020). The roles of acclimation and behaviour in buffering climate change impacts along elevational gradients. *Journal of Animal Ecology*, 89(7), 1722-1734. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13222>
- Farquhar, M. G. y Palade, G. E. (1964). Functional organization of amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(4), 569-577. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.4.569>
- Felseburgh, F. A., de Carvalho-e-Silva, S. P. y de Brito-Gitirana, L. (2007). Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys* and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anuran, Leptodactylidae). *Micron*, 38(5), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.06.015>
- Felseburgh, F. A., de Almeida, P. G., de Carvalho-e-Silva, S. P. y de Brito-Gitirana, L. (2009). Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. *Micron*, 40(2), 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.09.003>
- Fernandez, P. J. y Bagnara, J. T. (1991). Effect of background color and low-temperature on skin color and circulating alpha-MSH in 2 species of leopard frog. *General and Comparative Endocrinology*, 83(1), 132-141. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(91\)90113-K](https://doi.org/10.1016/0016-6480(91)90113-K)
- Fernandez, P. J. y Collins, J. P. (1988). Effect of Environment and Ontogeny on Color Pattern Variation in Arizona Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum nebulosum* Hallowell). *Copeia*, 4, 928-938. <https://doi.org/10.2307/1445716>
- Forsman, A. (2014). Effects of genotypic and phenotypic variation on establishment are important for conservation, invasion, and infection biology. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 111(1), 302–307.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1317745111>

Frost, S. K. y Robinson, S. J. (1984). Pigment cell differentiation in the fire-bellied toad, *Bombina orientalis*. I. Structural, chemical, and physical aspects of the adult pigment pattern. *Journal of Morphology*, 179(3), 229-242.

<https://doi.org/10.1002/jmor.1051790303>

Frost, D. R. (11 de Julio de 2021). *Amphibian Species of the World: an Online Reference*, V6.1. American Museum of Natural History.

<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>

Fujii, R. (1993). Cytophysiology of fish chromatophores. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology*, 143, 191-255. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61876-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61876-8)

Fukuzawa, T. y Ide, H. (1988). A ventrally localized inhibitor of melanization in *Xenopus laevis* skin. *Developmental biology*, 129(1), 25-36. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90158-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90158-3)

Fukuzawa, T. y Bagnara, J. T. (1989). Control of melanoblast differentiation in amphibia by alpha-melanocyte stimulating hormone, a serum melanization factor, and a melanization inhibiting factor. *Pigment Cell Research*, 2(3), 171-181.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1989.tb00183.x>

Fukuzawa, T., Samaraweera, P., Mangano, F. T., Law, J. H. y Bagnara, J. T. (1995). Evidence that MIF plays a role in the development of pigmentation patterns in the frog. *Developmental Biology*, 167(1), 148-158. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1013>

Giuliani, P., Zuccarini, M., Buccella, S., Rossini, M., D'Alimonte, I., Ciccarelli, R., Marzo, M., Marzo, A., Iorio, P. D. y Caciagli, F. (2016). Development of a new HPLC method using fluorescence detection without derivatization for determining purine nucleoside phosphorylase activity in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 1009-1010, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.012>

- Goda, M. (2017). Rapid integumental color changes due to novel iridophores in the chameleon sand tilefish *Hoplolatilus chlupaty*. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 30(3), 368-371. <https://doi.org/10.1111/pcmr.1258>
- Goniakowska-Witalinska, L. y Kubiczek, U. (1998). The structure of the skin of the tree frog (*Hyla arborea arborea* L.). *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 180(3), 237-246. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(98\)80080-0](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(98)80080-0)
- Grether, G. F., Kolluru, G. R. y Nersissian, K. (2004). Individual colour patches as multicomponent signals. *Biological Reviews*, 79(3), 583-610. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006390>
- Greven, H., Zanger, K. y Schwinger, G. (1995). Mechanical properties of the skin of *Xenopus laevis* (Anura, Amphibia). *Journal of Morphology*, 224(1), 15-22. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052240103>
- Grey-Wilson, C. y Blamey, M. (1980). *Guía de las flores alpinas de Europa*. Ediciones Omega.
- Gur, D., Leshem, B., Farstey, V., Oron, D., Addadi, L. y Weiner, S. (2016). Light-Induced Color Change in the Sapphirinid Copepods: Tunable Photonic Crystals. *Advanced Functional Materials*, 26(9), 1393-1399. <https://doi.org/10.1002/adfm.201504339>
- Hadley, M. E. y Quevedo, W. C. (1966). Vertebrate epidermal melanin unit. *Nature*, 209, 1334-1335. <https://doi.org/10.1038/2091334a0>
- Helmus, M. y Behm, J. E. (2020). Island Biogeography Revisited. En M. I. Goldstein y D. A. DellaSala (Eds.), *Encyclopedia of the World's Biomes* (Vol. 1, pp. 51-56). Academic Press-Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11945-1>
- Herczeg, G., Matsuba, C. y Merilä, J. (2010). Sequence variation in the melanocortin-1 receptor gene (Mc1r) does not explain variation in the degree of melanism in a widespread amphibian. *Annales Zoologici Fennici*, 47(1), 37-45.
- Hjernquist, M. B., Söderman, F., Jönsson, K. I., Herczeg, G., Laurila, A. y Merilä, J. (2012). Seasonality determines patterns of growth and age structure over a geographic

- gradient in an ectothermic vertebrate. *Oecologia*, 170, 641–649.
<https://doi.org/10.1007/s00442-012-2338-4>
- Hoffman, E. A. y Blouin, M. S. (2000). A review of colour and pattern polymorphisms in anurans. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70(4), 633-665.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2000.tb00221.x>
- Holt, A. L., Vahidinia, S., Gagnon, Y. L., Morse, D. E. y Sweeney, A. M. (2014). Photosymbiotic giant clams are transformers of solar flux. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(101), 20140678. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0678>
- Huxley, A. F. (1968). A theoretical treatment of the reflexion of light by multilayer structures. *Journal of Experimental Biology*, 48(2), 227-245. <https://doi.org/10.1242/jeb.48.2.227>
- Katz, U. y Graham, R. (1980). Water relations in the toad (*Bufo viridis*) and a comparison with the frog (*Rana ridibunda*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 67(2), 245-251. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(80\)90270-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(80)90270-4)
- Kennedy, A. D. (1993). Water as a limiting factor in the Antarctic terrestrial environment: A biogeographical synthesis. *Arctic and Alpine Research*, 25(4), 308-315.
<https://doi.org/10.2307/1551914>
- Khogali, A. y Al-Bar, O. F. (1992). A study of solar ultraviolet radiation at Makkah solar station. *Solar Energy*, 48(2), 79-87. [https://doi.org/10.1016/0038-092X\(92\)90036-A](https://doi.org/10.1016/0038-092X(92)90036-A)
- Khoo, G., Lim, T. M., Phang, V. P. E. (2014). Cellular Basis of Metallic Iridescence in the Siamese Fighting Fish, *Betta splendens*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 66, 988
- Knapp, R. A. y Matthews, K. R. (2000). Non-native fish introductions and the decline of the mountain yellow-legged frog from within protected areas. *Conservation Biology*, 14(2), 428-438. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99099.x>
- Kobelt, F. y Linsenmair, K. E. (1986) Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. I. The skin of *Hyperolius viridiflavus nitidulus* in wet and dry season conditions. *Oecologia*, 68, 533-541.
<https://doi.org/10.1007/BF00378768>

- Kobelt, F. y Linsenmair, K. E. (1992). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. VI. The iridophores in the skin as radiation reflectors. *Journal of Comparative Physiology B*, 162, 314-326. <https://doi.org/10.1007/BF00260758>
- Kramek, W. C. y Stewart, M. M. (1980). Ontogenetic and sexual differences in the pattern of *Rana septentrionalis*. *Journal of Herpetology*, 14(4), 369-375. <https://doi.org/10.2307/1563692>
- Kuriyama, T., Esashi, J. y Hasegawa, M. (2017). Light reflection from crystal platelets in iridophores determines green or brown skin coloration in *Takydromus* lizards. *Zoology*, 121, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.11.003>
- Lamb, J. Y. y Davis, M. P. (2020). Salamanders and other amphibians are aglow with biofluorescence. *Scientific Reports*, 10, 2821. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59528-9>
- Lampert, K. P. y Linsenmair, K. E. (2002). Alternative life cycle strategies in the West African reed frog *Hyperolius nitidulus*: the answer to an unpredictable environment? *Oecologia*, 130, 364-372. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0821-4>
- Land, M. F. (1972). The physics and biology of animal reflectors. *Progress in Biophysics Molecular Biology*, 24, 75-106. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(72\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0079-6107(72)90004-1)
- Le Quang-Trong, Y. y Bouligand, Y. (1976). Les desmosomes et l'orientation des tonofilaments dans le tégument des anoures. *Bulletin la Société zoologique de France*, 101(4), 637-645.
- Ligon, R. A. y McCartney, K. L. (2016) Biochemical regulation of pigment motility in vertebrate chromatophores: a review of physiological color change mechanisms. *Current Zoology*, 62(3), 237-252. <https://doi.org/10.1093/cz/zow051>
- Lind, M. I. y Johansson, F. (2007). The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(4), 1288-1297. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01353.x>

- Lind, M. I. y Johansson, F. (2011). Testing the role of phenotypic plasticity for local adaptation: growth and development in time-constrained *Rana temporaria* populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(12), 2696-2704. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02393.x>
- Lind, M. I., Ingvarsson, P. K., Johansson, H., Hall, D. y Johansson, F. (2011). Gene flow and selection on phenotypic plasticity in an island system of *Rana temporaria*: *Evolution*, 65(3), 684–697. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01122.x>
- Ling, J. K. (1972). Adaptive functions of vertebrate molting cycles. *American Zoologist*, 12(1), 77-93. <https://doi.org/10.1093/icb/12.1.77>
- Lomolino, M. V., Riddle, B. R. y Whittaker, R. J. (2016). *Biogeography: Biological diversity across space and time* (5ª ed.). Sinauer Associates.
- Lyerla, T. A. y Jameson, D. L. (1968). Development of Color in Chimeras of Pacific Tree Frogs. *Copeia*, 1, 113-128. <https://doi.org/10.2307/1441558>
- Marquis, O., Miaud, C. y Lena, J. P. (2008). Developmental responses to UV-B radiation in common frog *Rana temporaria* embryos from along an altitudinal gradient. *Population Ecology*, 50(2), 123-130. <https://doi.org/10.1007/s10144-007-0071-3>
- Marks, M. S. y Seabra, M. C. (2001). The melanosome: Membrane dynamics in black and white. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(10), 738-748. <https://doi.org/10.1038/35096009>
- Matsumoto, J. (1965). Studies on fine structure and cytochemical properties of erythrophores in swordtail, *Xiphophorus helleri*, with special reference to their pigment granules (pterinosomes). *The Journal of Cell Biology*, 27(3), 493-504. <https://doi.org/10.1083/jcb.27.3.493>
- McCallum, M. L. (2007). Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology*, 41(3), 483-491. [http://dx.doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[483:ADOECD\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[483:ADOECD]2.0.CO;2)

- Merrell, D. J. (1972). Laboratory studies bearing on pigment pattern polymorphisms in wild populations of *Rana pipiens*. *Genetics*, 70(1), 141-161. <https://doi.org/10.1093/genetics/70.1.141>
- Mills, J. W. y Prum, B. E. (1984). Morphology of the exocrine glands of the frog-skin. *American Journal of Anatomy*, 171(1), 91-106. <https://doi.org/10.1002/aja.1001710108>
- Miramontes-Sequeiros, L. C., Palanca-Castán, N., Caamaño-Chinchilla, L. y Palanca-Soler, A. (2018a). The phenotypic variability in *Rana temporaria* decreases in response to drying habitats. *Science of the Total Environment*, 612, 538-543. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.261>
- Miramontes-Sequeiros, L. C., Palanca-Castán, N. y Palanca-Soler, A. (2018b). Effect of fish stocking on alpine populations of European common frog (*Rana temporaria*) in the Pyrénées National Park. *Herpetological Journal*, 28(1), 43-49.
- Montgomerie, R. (2006). Analyzing colors. En K. J. McGraw, y G. E. Hill (Eds.), *Bird Coloration: Mechanisms and Measurements* (Vol. 1, pp. 90-147). Harvard University Press
- Moreno-Gómez, F., Duque, T., Fierro, L., Arango, J. Peckham, X. y Asencio-Santofimio, H. (2014). Histological Description of the Skin Glands of *Phyllobates bicolor* (Anura: Dendrobatidae) Using Three Staining Techniques. *International Journal of Morphology*, 32(3), 882-888. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000300022>
- Morrison, R. L. (1995). A Transmission Electron-Microscopic (TEM) Method for Determining Structural Colors Reflected by Lizard Iridophores. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 8(1), 28-36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1995.tb00771.x>
- Nadeau, N. J., Minvielle, F., Ito, S., Inoue-Murayama, M., Gourichon, D., Follett, S. A., Burke, T. y Mundy, N. I. (2008). Characterization of Japanese Quail yellow as a Genomic Deletion Upstream of the Avian Homolog of the Mammalian ASIP (agouti) Gene. *Genetics*, 178(2), 777-786. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.077073>

- Newman, R. A. (1989). Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, 70(6), 1775-1787. <https://doi.org/10.2307/1938111>
- Nielsen, H. I. y Dyck, J. (1978). Adaptation of tree frog, *Hyla cinerea*, to colored backgrounds, and the role of the three chromatophore types. *Journal of Experimental Zoology*, 205(1), 79-94. <https://doi.org/10.1002/jez.1402050111>
- Obika, M. (1963). Association of pteridines with amphibian larval pigmentation and their biosynthesis in developing chromatophores. *Developmental Biology*, 6(1), 99-112. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(63\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(63)90007-1)
- Oromi, N., Camarasa, S., Sanuy, I. y Sanuy, D. (2015). Variation of growth rate and survival in embryos and larvae of *Rana temporaria* populations from the Pyrenees. *Acta Herpetologica*, 10(2), 85-91. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-16297
- Palanca-Soler, A. y Caamaño-Chinchilla, L. (2020). 100 Flores de Alta Montaña Pirenaica. *Revista de Fenología y Anatomía*, 1-102.
- Palo, J. U., O'Hara, R. B., Laugen, A. T., Laurila, A., Primmer, C. R. y Merilä, J. (2003). Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Molecular Ecology*, 12(7), 1963-1978. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01865.x>
- Parakkal, P. F. y Matoltsy, A. G. (1964). Study of fine structure of epidermis of *Rana pipiens*. *Journal of Cell Biology*, 20(1), 85-94. <https://doi.org/10.1083/jcb.20.1.85>
- Parker, G. H. (1948). Animal Color Changes and Their Neurohumours. Cambridge University Press.
- Posso-Terranova, A. y Andrés, J. A. (2017). Diversification and convergence of aposematic phenotypes: truncated receptors and cellular arrangements mediate rapid evolution of coloration in harlequin poison frogs. *Evolution*, 71(11), 2677-2692. <https://doi.org/10.1111/evo.13335>

- Rabbani, M., Zacharczenko, B. y Green, D. M. (2015). Color Pattern Variation in a Cryptic Amphibian, *Anaxyrus fowleri*. *Journal of Herpetology*, 49(4), 649-654.
<https://doi.org/10.1670/14-114>
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17(1), 208-212.
<https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
- Richards, C. M. y Nace, G. W. (1983). Dark pigment variants in Anurans: Classification, new descriptions, color changes and inheritance. *Copeia* 4, 979-990.
<https://doi.org/10.2307/1445100>
- Riffler, M., Lieberherr, G. y Wunderle, S. (2015). Lake surface water temperatures of European Alpine lakes (1989–2013) based on the Advanced Very High Resolution Radiometer (AVHRR) 1 km data set. *Earth System Science Data*, 7, 1–17.
<https://doi.org/10.5194/essd-7-1-2015>
- Riobo, A., Rey, J., Puente, M., Miramontes, C. y Vences, M. (1999). Ontogenetic increase of black dorsal pattern in *Rana temporaria*. *British Herpetological Society Bulletin*, 70, 1-6.
- Robinson, C. T. y Oertli, B. (2009). Long-term Biomonitoring of Alpine Waters in the Swiss National Park. *Journal on Protected Mountain Areas Research and Management*, 1(1). <https://doi.org/10.1553/eco.mont1s23>
- Rollins-Smith, L. A. (2017). Amphibian immunity-stress, disease, and climate change. *Developmental and Comparative Immunology*, 66, 111-119.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.002>
- Rosbach, S., Subedi, R. C., Ng, T. K., Ooi, B. S. y Duarte, C. M. (2020). Iridocytes Mediate Photonic Cooperation Between Giant Clams (Tridacninae) and Their Photosynthetic Symbionts. *Frontiers in Marine Science*, 7, 465.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00465>
- Roubos, E. W., Van Wijk, D. C. W. A., Kozicz, T., Scheenen, W. J. J. M. y Jenks, B. J. (2010). Plasticity of melanotrope cell regulations in *Xenopus laevis*. *European Journal*

of *Neuroscience*, 32(12), 2082-2086. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07526.x>

Rowlands, A. (1952). The influence of water and light upon the color change of sightless frogs (*Rana temporaria*). *Journal of Experimental Biology*, 29, 127-136.

Rudh, A., y Qvarnstrom, A. (2013). Adaptive colouration in amphibians. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24(6-7), 553-561. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.05.004>

Saenko, S. V., Teyssier, J., van der Marel, D. y Milinkovitch, M. C. (2013). Precise colocalization of interacting structural and pigmentary elements generates extensive color pattern variation in *Phelsuma* lizards. *BMC Biology*, 11:105. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-105>

Schmitt, T., Muster, C. y Schönswetter, P. (2010). Are Disjunct Alpine and Arctic-Alpine Animal and Plant Species in the Western Palearctic Really "Relics of a Cold Past"? En J. C. Habel y T. Assmann (Eds.), *Relict Species* (pp. 239-252). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92160-8_13

Schneider, C. A., Rasband, W. S. y Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Shen, Z. (2017). Mountain Biogeography. En D. Richardson, N. Castree, M. F. Goodchild, A. Kobayashi, W. Liu y R. A. Marston (Eds.), *International Encyclopedia of Geography: People, the Earth, Environment and Technology* (1ª ed., pp. 1-7). John Wiley and Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118786352.wbieg0369>

Sillero, N., Campos, J., Bonardi, A., Corti, C., Creemers, R., Crochet, P. A., Crnobrnja-Isailovic, J., Denoël, M., Ficetola, G. F., Gonçalves, J., Kuzmin, S., Lymberakis, P., de Pous, P., Rodríguez, A., Sindaco, R., Speybroeck, J., Toxopeus, B., Vieites, D. R. y Vences, M. (2014). Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia* 35(1), 1-31.

- Smith-Gill, S. J., Richards, C. M. y Nace, G. W. (1972). Genetic and metabolic bases of two "albino" phenotypes in leopard frog, *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Zoology*, 180(2), 157-167. <https://doi.org/10.1002/jez.1401800203>
- Sommaruga, R. y Psenner, R. (1997). Ultraviolet radiation in a high mountain lake of the Austrian Alps: Air and underwater measurements. *Photochemistry and Photobiology*, 65(6), 957-963. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb07954.x>
- Sommaruga, R. (2001). The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62(1-2), 35-42. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00154-3)
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L. y Waller, R. W. (2004). Status and trends of Amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1785. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Sumida, M., Islam, M. M., Igawa, T., Kurabayashi, A., Furukawa, Y., Sano, N., Fujii, T. y Yoshizaki, N. (2016) The first see-through frog created by breeding: description, inheritance patterns, and dermal chromatophore structure. *Scientific Reports*, 6, 24431. <https://doi.org/10.1038/srep24431>
- Taboada, C., Brunetti, A. E., Pedron, F. N., Neto, F. C., Estrin, D. A., Bari, S. E., Chemes, L. B., Lopes, N. P., Lagorio, M. G. y Faivovich, J. (2017). Naturally occurring fluorescence in frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(14), 3672-3677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701053114>
- Tattersall, G. J., Eterovick, P. C. y de Andrade, D. V. (2006). Tribute to R.G. Boutilier: Skin colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956). *Journal of Experimental Biology*, 209(7), 1185-1196. <https://doi.org/10.1242/jeb.02038>
- Taylor, J. D. (1969). The effects of intermedin on the ultrastructure of Amphibian iridophores. *General and Comparative Endocrinology*, 12(3), 405-416. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(69\)90157-9](https://doi.org/10.1016/0016-6480(69)90157-9)

- Teyssier, J., Saenko, S. V., van der Marel, D. y Milinkovitch, M. C. (2015). Photonic crystals cause active colour change in chameleons: *Nature Communications*, 6, 6368. <https://doi.org/10.1038/ncomms7368>
- Toledo, R. C. y Jared, C. (1993). Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology*, 105(4), 593-608. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90259-7)
- Tracy, C. R. (1976). A model of dynamic exchanges of water and energy between a terrestrial amphibian and its environment. *Ecological Monographs*, 46(3), 293-326. <https://doi.org/10.2307/1942256>
- Udenfriend, S. y Zaltzman, P. (1962). Fluorescence characteristics of purines, pyrimidines, and their derivatives: Measurement of guanine in nucleic acid hydrolyzates. *Analytical Biochemistry*, 3(1), 49-59. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90043-X)
- Umbers, K. D. L., Silla, A. J., Bailey, J. A., Shaw, A. K. y Byrne, P. G. (2016). Dietary carotenoids change the colour of Southern corroboree frogs. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(2), 436-444. <https://doi.org/10.1111/bij.12818>
- Vences, M., Piqué, N., Lopez, A., Puente, M., Miramontes-Sequeiros, C. y Vieites, D. (1999). Summer habitat population estimate and body size variation in a high altitude population of *Rana temporaria*, *Amphibia-Reptilia*, 20(4), 431-435. <https://doi.org/10.1163/156853899x00475>
- Vences, M., Galán, P., Vieites, D. R., Puente, M., Oetter, K. y Wanke, S. (2002). Field body temperatures and heating rates in a montane frog population: the importance of black dorsal pattern for thermoregulation. *Annales Zoologici Fennici*, 39, 209-220.
- Voûte, C. L. (1963). An electron microscopic study of the skin of the frog *Rana pipiens*. *Journal of Ultrastructure Research*, 9(5-6), 497-510. [http://doi.org/10.1016/S0022-5320\(63\)80081-7](http://doi.org/10.1016/S0022-5320(63)80081-7)
- Wallace, H., Badawy, G. M. I. y Wallace, B. M. N. (1999). Amphibian sex determination and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 901-909. <https://doi.org/10.1007/s000180050343>

- Wake, D. B. y Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(Supplement 1), 11466-11473. <http://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- Yasutomi, M. y Hama, T. (1971). Ultramicroscopic study of developmental change of xanthophore in frog, *Rana japonica* with special reference to pterinosomes. *Development Growth and Differentiation*, 13(3), 141-149. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1971.00141.x>
- Yasutomi, M. y Hama, T. (1976). Electron microscopic demonstration of tyrosinase in pterinosomes of the frog xanthophore, and the origin of pterinosomes. *Development, Growth and Differentiation*, 18(3), 289-299. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1976.00289.x>
- Zuasti, A., Jiménez-Cervantes, C., García-Borrón, J. C., y Ferrer, C. (1998). The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology*, 61(4), 305-316. <https://doi.org/10.1679/aohc.61.305>

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Características del área de estudio y de las muestras de piel en cinco ejemplares de R. temporaria.</i>	31
Tabla 2 <i>Características del lugar de muestreo y de las muestras de piel en cinco especímenes de R. temporaria.</i>	63
Tabla 3 <i>Densidad de iridóforos calculado en las muestras de piel de cinco especímenes de R. temporaria.</i>	70
Tabla 4 <i>Factores que influyen en el patrón de distribución de los iridóforos.</i>	71
Tabla 5 <i>Relación entre la temporalidad de los cuerpos de agua, la SVL y el grado de melanismo en 372 individuos de R. temporaria. Los valores de la tabla representan las frecuencias relativas (%).</i>	103
Tabla 6 <i>Relación entre la temporalidad de los cuerpos de agua y la SVL en 372 individuos de R. temporaria. Los valores de la tabla representan las frecuencias relativas (%).</i>	105
Tabla 7 <i>Características y ubicación de las 30 localidades donde se muestrearon un total de 372 individuos de R. temporaria.</i>	147
Tabla 8 <i>Relación entre la altitud, la temporalidad de los cuerpos de agua, la SVL y el grado de melanismo en 372 individuos de R. temporaria. Los valores de la tabla representan las frecuencias relativas (%).</i>	150

Lista de Figuras

- Figura 1** La rana bermeja, *R. temporaria*, habita en humedales del Pirineo Central.....11
- Figura 2** Vista panorámica del Pirineo Central. Se observa el aislamiento del área de estudio y la complejidad del paisaje. Los lagos glaciares se localizan a una altitud de 2000 a 2600 m s. n. m.12
- Figura 3** Perfil del Área de estudio. Se visualiza el perfil de altitud de la senda pirenaica GR-11 que cruza la cordillera de los Pirineos al límite norte de la Península Ibérica, Andorra y Francia. Las localidades muestreadas se localizan en las proximidades del recorrido de esta senda distribuidas en dos áreas con diferente geomorfología. El Área A representa las localidades situadas entre 1500 y 1800 m s. n. m. y el Área B las ubicadas entre 2000 y 2600 m s. n. m. El punto 1 indica la ubicación de las Charcas de Formigal subiendo a Anayet (Área A) y el punto 2 la localización del Ibón de las Ranas en Respomuso (Área B), en ambos puntos (1 y 2) se situaron dispositivos de registro de temperatura tipo "Datalogger iButton".12
- Figura 4** Ciclo biológico de la *R. temporaria* en el Área A y el Área B. Los colores representan los estadios de desarrollo en columnas: violeta - estadios juveniles (columna 1), rojo – subadultos (columna 2), azul claro - adultos (columnas 3 y 4), verde - renacuajos (columna 4), naranja - puestas (columna 4), azul oscuro - periodo de hibernación (columna 4). La columna 5 representa los meses divididos en quincenas. La columna 6 muestra el porcentaje de nieve acumulada en cada mes. Los cuadrados de color rojo claro representan los periodos de apareamiento. Los diagramas se elaboraron a partir de nuestros muestreos y las observaciones de Balcells (1975).15
- Figura 5** Sección transversal de piel dorsal sin manchas en *R. temporaria*. Los depósitos de melanina citocrina son escasos en la epidermis. A, B y C) Glándulas mucosas caracterizadas por células secretoras de tipo mucoso con el citoplasma vacuolado y el núcleo basal (A, Rana E1, escala = 50 μ m; B y C, Rana E3, escala = 100 μ m). D y E) Glándulas seromucosas con 2 tipos de células secretoras, mucosas con el citoplasma vacuolado, y serosas con gránulos acidófilos en la zona apical. Xantóforos en contacto con la membrana basal, debajo los iridóforos distribuidos en varias capas de células y melanóforos dérmicos con prolongaciones citoplasmáticas que rodean a los otros cromatóforos. Fibras musculares en superposición a los cromatóforos (D y E, Rana E1, escala = 50 μ m). F, G, H, I y J) Iridóforos distribuidos por toda la dermis esponjosa, próximos a la membrana basal bajo los xantóforos, que están aislados, en grupos y/o a mayor profundidad en contacto con el estrato compacto. Iridóforos inmersos entre las fibras de colágeno de la dermis compacta y localizados en haces perforantes que parten de la hipodermis y atraviesan el estrato compacto (F, G y H, Rana E4, escala = 50 μ m; I e J, Rana E5, escala = 100 μ m). Capilares (ca); células mioepiteliales (cmi); epidermis (E); dermis (D); glándula mucosa tipo 1 o seromucosa (g1), célula secretora

mucosa tipo 1 (g1a) y célula secretora serosa tipo 1 (g1b); conducto glandular (cg); glándula mucosa tipo 2 o mucosa (g2) y célula secretora mucosa tipo 2 (g2a); fibras musculares (fm); haces perforantes (hp); hipodermis (H); interdigitaciones (in); iridóforos (puntas de flecha); melanóforos dérmicos (md) y prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (mdc); melanóforos epidérmicos (me); membrana basal (mb); estrato compacto (scm); estrato córneo (sc); estrato germinativo (sg); estrato esponjoso (ss); xantóforos (x). Tinción con azul de metileno.....35

Figura 6 Sección transversal de piel dorsal con manchas en *R. temporaria*. Los melanóforos epidérmicos depositan melanina citocrina en las células adyacentes que oscurece la epidermis. A y B) Estrato córneo compuesto por 1 o 2 capas de células de queratinocitos cornificados y estrato germinativo formado por 3 o 4 capas de células poliédricas. Células basales del estrato germinativo en contacto con la membrana basal mediante interdigitaciones (A, Rana E2, escala = 100 µm; B, Rana E3, escala = 100 µm). C, D, E y F) Glándulas serosas muy voluminosas de morfología redondeada. Xantóforos en contacto con la membrana basal y bajo las capas de iridóforos. Melanóforos dérmicos debajo de los xantóforos y en contacto con los iridóforos (C, Rana E2; escala = 50 µm; D, Rana E3, escala = 100 µm; E y F, Rana E5, escala = 100 µm). G, H y I) Glándulas serosas de morfología ovalada. Iridóforos distribuidos en capas a diferente profundidad, próximos a los xantóforos junto a la membrana basal y en contacto con el estrato compacto. Iridóforos embebidos en el estrato compacto. Xantóforos e iridóforos en la hipodermis (G, H e I, Rana E4, escala = 50 µm). Capilares (ca); células mioepiteliales (cmi); conducto glandular (cg); epidermis (E); dermis (D); glándula mucosa tipo 1 o seromucosa (g1), célula secretora mucosa tipo 1 (g1a) y célula secretora serosa tipo 1 (g1b); glándula mucosa tipo 2 o mucosa (g2) y célula secretora mucosa tipo 2 (g2a); glándula serosa tipo 3 (g3); hipodermis (H); interdigitaciones (in); iridóforos (puntas de flecha); melanóforos dérmicos (md) y prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (mdc); melanóforos de la epidermis (me); melanina citocrina (mc); membrana basal (mb); estrato compacto (scm); estrato córneo (sc); estrato germinativo (sg); estrato esponjoso (ss); xantóforos (x). Tinción con azul de metileno.....38

Figura 7 Sección transversal de piel ventral en *R. temporaria*. A y B) Estrato córneo compuesto por 1 a 2 capas de queratinocitos cornificados y estrato germinativo formado por 6 a 8 capas de células poliédricas. Interdigitaciones en las células basales. Glándulas mucosas y seromucosas rodeadas por células mioepiteliales. Xantóforos en contacto con la membrana basal. Iridóforos distribuidos en varias capas de células: bajo los xantóforos y a diferente altitud en dicho estrato. Iridóforos inmersos en el estrato compacto, en los haces perforantes y en la hipodermis (A y B, Rana E3, escala 100 µm). Células mioepiteliales (cmi); epidermis (E); dermis (D); glándula mucosa tipo 1 o seromucosa (g1), célula secretora mucosa tipo 1 (g1a) y célula secretora serosa tipo 1 (g1b); glándula mucosa tipo 2 o mucosa (g2) y célula secretora mucosa tipo 2 (g2a); haces perforantes (hp); hipodermis (H); interdigitaciones

(in); membrana basal (mb); estrato compacto (scm); estrato córneo (sc); estrato germinativo (sg); estrato esponjoso (ss). Tinción con azul de metileno.39

Figura 8 Epidermis y dermis de una sección transversal de piel dorsal de área con manchas melánicas de *R. temporaria*. La lámina es una composición realizada con varias micrografías electrónicas de transmisión. Ultraestructura de la epidermis, la membrana basal y el estrato esponjoso de la dermis (*Rana* E5, escala = 5 μ m). Epidermis (E); dermis (D); membrana basal (mb).42

Figura 9 Epidermis en sección transversal de piel dorsal en *R. temporaria*. A) Estrato córneo con dos capas de queratinocitos aplanados. Melanóforo con prolongaciones dendríticas y queratinocitos con depósitos de melanina citocrina en el estrato germinativo (*Rana* E5, escala = 5 μ m). B) Melanóforo localizado próximo a la membrana basal con melanosomas en el citoplasma (*Rana* E5, escala = 5 μ m). C) Células basales del estrato germinativo con núcleo grande y extensiones citoplasmáticas que penetran en la dermis. Espacios intercelulares entre las células (*Rana* E5, escala = 5 μ m). D) Células del estrato córneo escamosas, con el citoplasma lleno de tonofilamentos y unidas entre sí mediante uniones intercelulares. La superficie externa presenta protuberancias y una capa de moco. Estrato córneo unido al estrato germinativo mediante desmosomas (*Rana* E5, escala = 1 μ m). E) Melanóforo con el citoplasma lleno de melanosomas. Células del estrato germinativo con tonofilamentos en su citoplasma y desmosomas (*Rana* E5, escala = 1 μ m). F) Membrana basal formada por la lámina basal y la lámina reticulada. La lámina basal está compuesta por la lámina lúcida y la lámina densa. En contacto, xantóforos con pterinosomas en su citoplasma (*Rana* E5, escala = 2 μ m). G) Área con mancha melánica. Los melanóforos de la epidermis depositan melanina citocrina en los queratinocitos vecinos. Los queratinocitos tienen gránulos mucosos en su citoplasma (*Rana* E4, escala = 2 μ m). H) Área sin mancha melánica. Los depósitos de melanina citocrina son escasos. Capa de moco sobre la superficie externa de la epidermis (*Rana* E4, escala = 5 μ m). Células basales (cb); desmosomas (des); extensiones citoplasmáticas (ec); espacios intercelulares (eic); lámina lúcida (Li); lámina densa (Ld); lámina reticular (Lr); melanina citocrina (mc); melanóforos de la epidermis (me); melanosomas (ml); membrana basal (mb); prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (mdc); gránulo mucoso (mg); moco (mo); núcleo (nu); protuberancias (pro); pterinosomas (pt); estrato córneo (sc); estrato germinativo (sg); tonofilamentos (to); uniones intercelulares (ui); xantóforo (x).45

Figura 10 Epidermis en sección transversal de piel ventral en *R. temporaria*. Estrato córneo con células queratinizadas, se observan las uniones intercelulares y gránulos mucosos en el citoplasma. La superficie externa presenta protuberancias y una capa de moco (*Rana* E3, escala = 2 μ m). Gránulo mucoso (mg); moco (mo); protuberancias (pro); uniones intercelulares (ui).46

Figura 11 Sección transversal de la dermis de piel dorsal con mancha melánica en *R. temporaria*. A) Los xantóforos se localizan junto a la membrana basal formando una capa y debajo de los iridóforos. Bajo los xantóforos se localizan los

iridóforos. Los melanóforos de la dermis tienen prolongaciones citoplasmáticas que rodean a xantóforos e iridóforos (Rana E4, escala = 5 μ m). B) Xantóforos en contacto con la membrana basal. Los pterinosomas del citoplasma se caracterizan por la presencia de lamelas concéntricas electrodensas (Rana E4, escala = 2 μ m). C) Iridóforos con plaquetas reflectantes en el citoplasma (Rana E4, escala = 1 μ m). D) Fibras musculares sobre los cromatóforos y alrededor de estos (Rana E4, escala = 1 μ m). E) Células mioepiteliales rodeando la glándula mucosa. Células secretoras mucosas, el núcleo es aplanado y basal, el citoplasma contiene gránulos mucosos (Rana E4, escala = 5 μ m). F y G) Límite del estrato esponjoso con el estrato compacto. Xantóforo localizado en el estrato compacto. Las fibras de colágeno están entrecruzadas, se visualizan en sección longitudinal y transversal (Rana E4, escala = 5 μ m). H) Melanóforo localizado en el estrato compacto (Rana E4, escala = 5 μ m). Capilar (ca); fibras de colágeno en sección longitudinal (fcl) y en sección transversal (fct); glándula mucosa tipo 2 o mucosa (g2) y célula secretora mucosa tipo 2 (g2a); iridóforo (i); lumen glandular (lu); membrana basal (mb); melanóforo dérmico (md) y prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (mdc); melanosoma (ml); núcleo (nu); plaqueta reflectante (pr); pterinosoma (pt); estrato compacto (scm); estrato esponjoso (ss); xantóforo (x).50

Figura 12 Sección transversal de la dermis de la piel ventral en *R. temporaria*. Fibras de colágeno entrecruzadas de la dermis compacta, se distinguen las fibras seccionadas transversal y longitudinalmente. Iridóforos con plaquetas reflectantes localizados entre las fibras de colágeno (Rana E3, escala = 1 μ m). Fibras de colágeno en sección longitudinal (fcl) y en sección transversal (fct); iridóforo (i); plaquetas reflectantes (pr); estrato compacto (scm).51

Figura 13 Micrografía MET de los iridóforos inmersos en el estrato esponjoso de la piel de *R. temporaria*. Se observan dos iridóforos (ir1 e ir2) y sus núcleos (nc), las áreas vacías (es) originadas tras la eliminación de las plaquetas cristalinas reflectantes durante el proceso de contrastado, el citoplasma (ci), las prolongaciones citoplasmáticas de los melanóforos (me) y las fibras musculares (fm). Barra = 5 μ m.68

Figura 14 Sección transversal de la piel dorsal en área sin mancha de *R. temporaria*. Los melanóforos (me) se localizan debajo de los iridóforos. Los iridóforos (ir) se distribuyen en capas en el estrato esponjoso (ss). El grosor de las capas varía de una a varias capas de células. Se distinguen los núcleos de los iridóforos (nc). Azul de metileno. Barra = 50 μ m.69

Figura 15 Imagen confocal de una sección transversal no teñida de la piel dorsal de *R. temporaria* observada bajo una fuente de excitación UV (λ láser = 405 nm). Los iridóforos (ir) emiten fluorescencia azul brillante. Barra = 100 μ 72

Figura 16 Sección transversal no teñida de la piel dorsal de *R. temporaria* superpuesta a la imagen confocal observada bajo una fuente de excitación UV (λ láser = 405 nm). Se visualizan los iridóforos (ir) emitiendo fluorescencia azul brillante y los melanóforos oscuros. Barra = 100 μ m.72

- Figura 17** Espectro de emisión de los iridóforos de una sección de piel de *R. temporaria*. El eje X representa la longitud de onda [nm] de la radiación emitida en el ancho de banda de 440 a 520 nm por los iridóforos excitados con una fuente de radiación UV a 405 nm.73
- Figura 18** Mapa del área de estudio y puntos de muestreo en la ladera sur del Pirineo Central. El mapa pequeño en la esquina inferior derecha indica la localización aproximada del área estudiada. Los triángulos en la imagen principal señalan la ubicación de los puntos de muestreo. Los triángulos rojos designan los cuerpos de agua temporales y los triángulos azules los cuerpos de agua permanentes. Los trazos discontinuos delimitan la frontera entre España y Francia. Las elipses negras acotan las dos áreas de estudio principales: Aguas Tuertas - Portalet (Área A) y Formigal - Bachimaña (Área B). Las líneas de altitud en azul se corresponden a 1600 m s. n. m. y las que están en rojo a 2400 m s. n. m.82
- Figura 19** Ejemplos de los tipos de piel definidos en el análisis de la coloración dorsal. La primera columna muestra la imagen utilizada para el análisis de color y la segunda columna su correspondiente histograma RGB. La tercera columna es una fotografía parcial del animal del que se tomaron los datos.85
- Figura 20** Análisis de componentes principales de los casos seleccionados que muestran la clasificación en torno a cinco grupos diferentes de tipos de piel. La Función 1 representa en un 0,985 la distancia entre el azul y el verde y la Función 2 representa en un 0,947 la distancia entre el verde y el rojo. Las distancias se refieren a las distancias de los histogramas RGB (Figura 19, segunda columna).87
- Figura 21** Relación entre el tamaño del cuerpo, el color y la temporalidad del cuerpo de agua. A) Se muestra el porcentaje de animales con cada tipo de piel en cuerpos de agua temporales y permanentes. B) Se representa la SVL media (cm) en cada tipo de piel. Las barras de error son la desviación estándar. C) Porcentaje de ranas con cada tipo de piel en cuerpos de agua temporales o permanentes.89
- Figura 22** Comparación de los cuerpos de agua permanentes (lado izquierdo) y temporales (lado derecho) del área de estudio en la ladera sur de los Pirineos.91
- Figura 23** *Condiciones de temperatura en los cuerpos de agua permanentes.* A) Fotografía del Ibón de las ranas y detalle de la ubicación de los dispositivos de registro de temperatura, bajo el agua y fuera del agua. B) Gráfico de las temperaturas medias mensuales en relación al ciclo vital de las ranas en los cuerpos de agua permanentes durante un periodo de seis años. La curva azul representa la temperatura media mensual ambiental y la curva roja es la temperatura media mensual bajo el agua.99
- Figura 24** Patrón dorsal de manchas oscuras en *R. temporaria*. Se observa el área melánica (N_B). A) Coeficiente máximo ($C_A = 59.77\%$). B) Coeficiente mínimo ($C_B = 0.86\%$). C es el porcentaje de manchas oscuras calculado mediante la

siguiente ecuación $[C (\%) = 100(N_B / N_T)]$, N_B = Nº total de píxeles negros del área seleccionada; N_T = Nº total de píxeles RGB del área seleccionada.....102

Figura 25 Relación ente el grado de melanismo y las diferentes variables. A) Porcentaje de animales con diferente grado de melanismo localizados en cuerpos de agua temporales y permanentes. B) Porcentaje de animales con diferente grado de melanismo en función de su SVL. C) Porcentaje de ranas con diferente SVL localizados en cuerpos de agua temporales o permanentes.104

Lista de Apéndices

Apéndice 1	<i>Lista de especies de anuros citados en la Tesis.....</i>	146
Apéndice 2	<i>Material complementario correspondiente al Capítulo IV.....</i>	147

Apéndice 1

Lista de especies de anuros citados en la Tesis. Para evitar el uso de sinónimos en los nombres de las especies, los anfibios anuros se citan tal y como aparecen en la ASW según Frost (2021).

Agalychnis dacnicolor (=Phyllomedusa
dacnicolor)

Lithobates septentrionalis (=Rana
septentrionalis)

Amietia fuscigula (=Rana fuscigula)

Odontophrynus americanus

Anaxyrus fowleri

Pithecopus rohdei (=Phyllomedusa
rohdei)

Bokermannohyla alvarengai

Phyllobates bicolor

Bombina orientalis

Phyllomedusa sauvagii (=Phyllomedusa
sauvagei)

Chiromantis petersii (=Chiromantis
petersi)

Proceratophrys boiei

Dryophytes arenicolor (=Hyla arenicolor)

Ptychadena mascareniensis

Glandirana rugosa (=Rana rugosa)

Rana esculenta

Hyla arborea

Rana japonica

Hyla cinerea

Rana temporaria

Hyperolius viridiflavus

Rhinella icterica (=Bufo ictericus)

Lithobates catesbeianus (=Rana
catesbeiana)

Rhinella marina (=Bufo marinus)

Lithobates chiricahuensis (=Rana
chiricahuensis)

Scinax nasicus

Lithobates clamitans (=Rana clamitans)

Xenopus laevis

Lithobates pipiens (=Rana pipiens)

Apéndice 2**Tabla 7** Características y ubicación de las 30 localidades donde se muestrearon un total de 372 individuos de *R. temporaria*.

Lugar de muestreo	Localidad	Latitud N	Longitud W	Altitud [m s. n. m.]	N
Cuerpos de agua permanentes	Aguas Tuertas	42° 49' 46.0"	0° 37' 38.0"	1676	23
	Barranco de Aspe	42° 47' 14.4"	0° 33' 18.7"	1570	5
	Ibón de Escalar	42° 49' 18.2"	0° 30' 13.7"	2085	12
	Ibones de Anayet	42° 46' 50.1"	0° 26' 33.6"	2209	5
	Barranco de Anayet	42° 46' 30.1"	0° 25' 51.6"	1974	30
	Ibón de Espelunciecha	42° 47' 15.8"	0° 25' 45.9"	1939	6
	Llano de Espelunciecha	42° 47' 26.7"	0° 25' 39.4"	1901	3
	Minas de Portalet	42° 48' 9.2"	0° 25' 5.3"	1772	20
	Pista de fondo	42° 48' 4.3"	0° 24' 42.4"	1772	18
	Formigal	42° 48' 8.3"	0° 24' 39.7"	1830	8
	Foratata	42° 47' 54.4"	0° 21' 35.0"	1991	8
	Arrieles	42° 50' 2.5"	0° 18' 50.2"	2197	14
	Parcela Experimental	42° 49' 1.3"	0° 17' 17.2"	2220	16
	Lagunas endorreicas A	42° 49' 2.1"	0° 17' 1.4"	2187	8
	Ibón das Ranas	42° 48' 49.3"	0° 16' 56.7"	2158	20
	Fuente del pastor	42° 48' 57.1"	0° 16' 31.9"	2182	3
	Campoplano	42° 48' 51.0"	0° 16' 11.8"	2146	4
	Ibones SW Facha	42° 48' 26.98"	0° 15' 15.82"	2448	26
	Bachimaña alto	42° 47' 21.5"	0° 14' 0.2"	2231	21
	Bachimaña bajo	42° 46' 49.71"	0° 13' 35.10"	2173	6
				Total	256
Cuerpos de agua temporales	Ibón des Moines	42° 50' 3.9"	0° 31' 20.8"	1707	4
	Ibones W pico Anayet	42° 47' 26.6"	0° 27' 10.2"	1867	4
	Ibón del Puerto	42° 47' 35.3"	0° 26' 28.2"	2115	5
	Subida a Espelunciecha	42° 48' 9.2"	0° 25' 5.3"	1772	6
	Lagunas endorreicas B	42° 49' 0.1"	0° 17' 3.9"	2216	7
	Refugio Viejo	42° 48' 45.6"	0° 17' 2.2"	2138	5
	Charcas Ibón das Ranas	42° 48' 49.3"	0° 16' 56.7"	2128	30
	Llano Aguaslimpias	42° 48' 44.4"	0° 16' 54.7"	2096	36
	Ibón Refugio Nuevo	42° 48' 52.3"	0° 16' 53.3"	2145	4
	Ibón Salamandras	42° 48' 52.6"	0° 16' 33.6"	2163	15
				Total	116

Nota. Se diferencian dos lugares de muestreo según la temporalidad de los cuerpos de agua, cuerpos de agua permanentes (lagos glaciares) y cuerpos de agua temporales (fuentes y arroyos). N es el número de individuos muestreados.

Análisis Estadístico

Para determinar el tipo de distribución de las variables se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. En todos los grupos analizados, el grado de melanismo (Z de Kolmogorov-Smirnov = 1,791; p = 0,003), la SVL (Z de Kolmogorov-Smirnov = 2,964; p = 0,000), la altitud (Z de Kolmogorov-Smirnov = 3,768; p = 0,000) y la insolación (Z de Kolmogorov-Smirnov = 2,397; p = 0,000), el valor crítico p es menor que 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis de normalidad.

El grado de melanismo mostró diferencias entre las medias de las siguientes variables: la SVL (ANOVA de una vía, F = 4,843; p = 0,008) y la altitud (ANOVA de una vía, F = 2,722; p = 0,044), ambas con un valor crítico p menor que 0,05. Pero no se observaron diferencias significativas entre medias en función de la longitud (ANOVA de una vía, F = 0,939; p = 0,392) ni de la insolación (ANOVA de una vía, F = 1,052; p = 0,351). También se investigó la relación entre la altitud y la SVL, no siendo los resultados significativos (ANOVA de una vía, F = 1,897; p = 0,152).

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se realizó el estadístico de Levene, en el caso del grado de melanismo respecto a la altitud (Estadístico de Levene = 0,434; p = 0,729), la longitud (Estadístico de Levene = 0,045; p = 0,956) y la insolación (Estadístico de Levene = 0,239; p = 0,787) se cumple la igualdad de varianzas. Sin embargo en el caso del grado melanismo respecto a la SVL (Estadístico de Levene = 7,522; p = 0,001) y de la altitud respecto a la SVL (Estadístico de Levene = 22,225; p = 0,000) las varianzas son diferentes ya que el valor crítico p es menor que 0,05.

Estos resultados revelan diferentes situaciones: en el caso del grado de melanismo respecto a la altitud se observa que la diferencia entre medias es significativa y las varianzas son iguales, en el caso del grado de melanismo respecto a la SVL se aprecia que la diferencia entre medias es significativa pero no se cumple la homogeneidad de las varianzas, y en los casos del grado de melanismo respecto a las variables longitud e insolación y de la altitud respecto a la SVL el análisis revela que la diferencia entre medias

no es significativa. Para continuar el análisis se descartaron los resultados no significativos y se realizaron pruebas no paramétricas.

Las variables se dividieron en categorías estudiando la relación entre el grado de melanismo y las diferentes variables para establecer intervalos optimizados. La optimización de grupos se realizó utilizando puntos de corte, diagramas de dispersión de puntos y seleccionando los grupos con mayor significación de acuerdo a la prueba de asociación Chi-cuadrado. Para medir la asociación entre las diferentes variables se generaron tablas de contingencia (Tabla 8), la correlación entre las variables se midió calculando el coeficiente Rho de Spearman.

La altitud se dividió en cuatro intervalos óptimos con una distancia entre ellos de 250 m: 1500 a 1750, 1751 a 2025, 2026 a 2300 y 2301 a 2450 m s. n. m. La SVL se dividió en tres categorías: ranas pequeñas ($1,50 \leq \text{SVL} \leq 2,10$ cm), ranas medianas ($2,11 \leq \text{SVL} \leq 6,00$ cm) y ranas grandes ($6,01 \leq \text{SVL} \leq 9,50$ cm). El grado de melanismo se dividió en dos categorías: individuos claros (C_L) o grupo de individuos con bajo porcentaje de manchas oscuras donde $C \leq 19\%$, e individuos oscuros (C_H) o grupo de individuos con alto porcentaje de manchas oscuras, $C > 19\%$, cuyo máximo se alcanza en $C = 60\%$.

Las correlaciones bivariadas no paramétricas (Rho de Spearman) entre las variables consideradas revelan que en el caso del grado de melanismo y la SVL ($\rho = 0,031$; $p = 0,556$) la correlación Rho de Spearman no es significativa. En el caso de la altitud y el grado de melanismo ($\rho = 0,132$; $p = 0,011$) y en el caso del grado de melanismo y la temporalidad de los cuerpos de agua ($\rho = 0,168$; $p = 0,001$) la correlación Rho de Spearman es muy baja.

Tabla 8 *Relación entre la altitud, la temporalidad de los cuerpos de agua, la SVL y el grado de melanismo en 372 individuos de R. temporaria. Los valores de la tabla representan las frecuencias relativas (%).*

Variables	Categorías	Grado de melanismo C			Chi-cuadrado de Pearson	
		C _L	C _H	Total	χ^2	<i>p</i>
Altitud (m s. n. m.)	1500 - 1750	81,25	18,75	100	6,956	0,073
	1751 - 2025	70,87	29,13	100		
	2026 - 2300	63,03	36,97	100		
	2301 - 2450	53,85	46,15	100		
	Total	66,12	33,87	100		
Temporalidad de los cuerpos de agua	Temporal	54,31	45,69	100	10,512	0,001
	Permanente	71,48	28,52	100		
	Total	66,13	33,87	100		
SVL (cm)	1,50 - 2,10	51,52	48,48	100	15,619	0,000
	2,11 - 6,00	72,66	27,34	100		
	6,01 - 9,50	52,00	48,00	100		
	Total	66,13	33,87	100		

Nota. Cada una de estas variables se dividió en diferentes categorías según intervalos optimizados. El grado de melanismo se dividió en dos grupos: C_L como el grupo de individuos con bajo porcentaje de manchas oscuras, $C \leq 19\%$, y C_H como el grupo de individuos con alto porcentaje de manchas oscuras, $C > 19\%$, cuyo máximo se alcanza en $C = 60\%$. En el caso de la altitud (Chi-cuadrado de Pearson, $p = 0,073$) no tiene influencia significativa respecto al grado de melanismo.

Índice de Anexos

Anexo 1 Manuscrito enviado para su publicación en *Oecologia*

Anexo 2 Manuscrito publicado en *Science of the Total Environment*

Anexo 3 Manuscrito enviado para su publicación en *Ichthyology and Herpetology*

Anexo 4 Atlas de Flora Pirenaica publicado en Revista de Fenología y Anatomía

Anexo 1

El Anexo 1 es un manuscrito enviado para su publicación en la revista Oecologia.
Para su redacción se utilizó y reestructuró parte del material incluido en el capítulo II.

Oecologia

The iridophores fluorescent pigments from high mountain *Rana temporaria* are photoprotective

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	The iridophores fluorescent pigments from high mountain <i>Rana temporaria</i> are photoprotective
Article Type:	Physiological ecology – original research
Corresponding Author:	Laura Caamaño-Chinchilla University of Vigo - Lagoas Marcosende Campus: Universidade de Vigo Vigo, SPAIN
Order of Authors:	Laura Caamaño-Chinchilla Pilar Caamaño-Chinchilla Antonio Palanca-Soler
Suggested Reviewers:	Susana Clusella-Trullas Stellenbosch University DST-NRF Centre of Excellence for Invasion Biology sct333@sun.ac.za Her research examine physiological responses of organisms to changing environmental conditions, with a strong focus on thermal biology. Claude Miaud Ecole Pratique des Hautes Etudes claud.miaud@ephe.psl.eu He researches in ecology and biology of alpine amphibians. He works at the Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive (CEFE), École Pratique des Hautes Études, Les Patios Saint-Jacques 4-14 rue Ferrus FR-75014 Paris, France. Julián Faivovich Bernardino Rivadavia Academy of Natural Sciences: Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia julian@macn.gov.ar Miguel Tejedo Estación Biológica de Doñana: Estacion Biologica de Donana CSIC tejedo@ebd.csic.es He is interested in the analysis of thermal adaptations of amphibians to their local climatic environments.
Opposed Reviewers:	
Funding Information:	
Abstract:	In this study, we describe how the iridophores within the skin of <i>Rana temporaria</i> dissipate excess energy from environmental ultraviolet (UV) radiation by emitting fluorescence. This protection mechanism represents a key factor in the adaptation of amphibians to arid environments that will provide universal knowledge about iridophores functionality. The studied European common frog specimens inhabits in the Central Pyrenees (France-Spain), at the southern limit of its distribution at altitudes between 1500 and 2700 m a. s. l. (meters above the sea level). The main resources to perform our laboratory research are microscopy techniques: transmission electron microscopy, optical microscopy and confocal fluorescence microscopy. Our results show that iridophores are fluorescent and photoprotective against UV radiation providing the skin frog a specific thermoregulation mechanism. This functionality prevents evaporative water loss (EWL) allowing the frogs to adapt in high mountain environments.

Cover letter

Dear editor,

We submit an original research paper entitled: "The iridophores fluorescent pigments from high mountain *Rana temporaria* are photoprotective". Our study is concerned with adaptations in European common frog in response to ultraviolet (UV) radiation in high mountain environments. These studies focusing on fluorescent pigments in iridophores are original in *Rana temporaria* species. These results have not been published anywhere else. We have performed advanced microscopy experiments to establish the connection between environmental UV radiation and the subsequent evaporative water loss by means of fluorescence emission.

Environmental stress due to climate change causes amphibian populations to decline worldwide, in addition, those specimens inhabiting extreme environmental conditions are especially sensitive to these factors. Enhancing our knowledge on specific adaptation mechanisms will enable us to develop strategies to ensure the conservation of biodiversity.

We hope that you will consider the paper for publication in such a reputed journal and look forward to your response.

Yours sincerely

Laura Caamaño-Chinchilla, Pilar Caamaño-Chinchilla and Antonio Palanca-Soler

[Click here to view linked References](#)

1 **The iridophores fluorescent pigments from high mountain *Rana temporaria* are**
2 **photoprotective**

3 Laura Caamaño-Chinchilla^{1*}, Pilar Caamaño-Chinchilla², Antonio Palanca-Soler²

4 ¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Fisiología, Biología Molecular, Mejora,
5 Protección y Producción Vegetal, Campus As Lagoas Marcosende, Universidad de Vigo,
6 36310, Vigo, Spain

7 ² Fundación Laboratorio de Anatomía Animal, c/ Julia Minguillón 2, 2º C, 36201, Vigo,
8 Spain

9

10 Corresponding Author: Laura Caamaño-Chinchilla, lauracaach@gmail.com

* Author Contribution: LCC, PCC and APS conceived and designed the experiment. LCC performed the experiments. LCC, PCC and APS analyzed the data and wrote the manuscript.

Abstract

In this study, we describe how the iridophores within the skin of *Rana temporaria* dissipate excess energy from environmental ultraviolet (UV) radiation by emitting fluorescence. This protection mechanism represents a key factor in the adaptation of amphibians to arid environments that will provide universal knowledge about iridophores functionality. The studied European common frog specimens inhabits in the Central Pyrenees (France-Spain), at the southern limit of its distribution at altitudes between 1500 and 2700 m a. s. l. (meters above the sea level). The main resources to perform our laboratory research are microscopy techniques: transmission electron microscopy, optical microscopy and confocal fluorescence microscopy. Our results show that iridophores are fluorescent and photoprotective against UV radiation providing the skin frog a specific thermoregulation mechanism. This functionality prevents evaporative water loss (EWL) allowing the frogs to adapt in high mountain environments.

Keywords

Chromatophore, guanine, thermoregulation, ultraviolet radiation, water loss

Introduction

Environmental stress due to climate change causes amphibian populations to decline worldwide; in addition, those specimens inhabiting extreme environmental conditions are especially sensitive to these factors (Rollins-Smith 2017). Geographical phenotypic plasticity, acclimation and thermoregulatory behavior together influence the vulnerability of amphibian species facing climate change (Enriquez-Urzelai et al. 2020). Enhancing our knowledge on specific adaptation mechanisms will enable us to develop strategies to ensure the conservation of biodiversity. In this work, we describe how skin iridophores, a type of chromatophores, in high altitude populations of *Rana temporaria*

dissipate excess energy of short wavelengths radiation by emitting fluorescence. This specific mechanism plays a crucial role in the survival of the species in this extreme environment acting as photoprotection against damaging ultraviolet (UV) radiation and preventing skin overheating.

European common frog, *R. temporaria* (*Amphibia*, *Anura*, *Ranidae*), is the most widespread amphibian species in Europe (Gasc et al. 1997). The Southern limit of its distribution is located on the Southern slope of Central Pyrenees from 1.500 to 2.700 m a. s. l. (meters above the sea level), which is the habitat of the target specimens in the present work. These Pyrenean mountain environments receive high doses of UV radiation, which affect all the local populations of organisms in there (Sommaruga and Psenner 1997; Sommaruga 2001).

Atmospheric UV radiation wavelength varies from 280 to 405 nm and can represent up to 6% of global solar radiation. The most damaging band is UV-B radiation with a wavelength going from 290 to 320 nm and the most abundant is UV-A radiation with a wavelength approximately going from 320 to 405 nm (Khogali and Al-Bar 1992; Ben-Zvi et al. 2015). The skin needs to dispel this damaging radiation by means of pigments, which absorb or reflect the incident light.

Frog pigments are located in four types of cells called chromatophores: melanophores with melanin, xanthophores with pteridines, erythrophores with carotenoids, and iridophores with guanine. The pigments of the melanophores, the xanthophores and the erythrophores absorb light radiation, whereas the iridophores reflect light radiation in its whole spectrum (Bagnara et al. 1968; Duellman and Trueb 1994; Bagnara and Matsumoto 2006; Ligon and McCartney 2016).

Iridophores are cells which integrate reflecting platelets in their cytoplasm, in amphibians these structures are formed by crystalline deposited purines (mainly

guanine) characterizing this organelle (Bagnara 1966; Taylor 1969; Bagnara and Matsumoto 2006). The iridophores platelets alternate with the cytoplasm stacking in layers (platelet, cytoplasm, platelet, etc.), each layer has its own refractive index causing interference phenomena, where a portion of the incident light is reflected with a characteristic wavelength called reflectance (Land 1972).

Reflectance depends on the refractive index of each layer, the thickness of the layers, the tilt angle of the reflecting platelets and the number of stacked platelets (Huxley 1968; Land 1972; Fujii 1993; Morrison 1995; Khoo et al. 2014; Goda 2017; Kuriyama et al. 2017). When the reflected light shifts to longer wavelengths and lower energies than the incident light, fluorescence phenomena takes place (Lamb and Davis 2020).

Crystallized guanine deposits form the reflecting platelets of the iridophores. These crystalline structures have been found to emit fluorescence when radiated with UV light so in synthetic compounds (Udenfriend and Zaltzman 1962; Assenza and Brown 1984; Giuliani et al. 2016; Rossbach et al. 2020) as in biological compounds (Taboada et al. 2017; Rossbach et al. 2020).

Fluorescence phenomena in guanine iridophores allows the species to dissipate excess energy from UV light leading to effective photoprotection. This photoprotection phenomenon has been well described in the giant clam, *Tridacna maxima* (*Bivalvia*, *Veneroida*, *Tridacninae*), its iridophores contain pure guanine reflecting platelets which act to regulate the UV light supply, protecting it from tissue damage by a fluorescence phenomenon (Rossbach et al. 2020). In *Hyperolius viridiflavus* (*Amphibia*, *Anura*, *Hyperoliidae*) the iridophores prevent overheating by reflecting UV radiation (Kobelt and Linsenmair 1986, 1992). *Bokermannohyla alvarengai* (*Amphibia*, *Anura*, *Hylidae*) regulates heat exchange through expansion and contraction of melanophores modulating iridophores effects (Centeno et al. 2015; Frost 2021).

Material and methods

General

We have achieved to describe the photoprotective mechanism against environmental UV radiation taking place in the skin of *R. temporaria* driven by iridophores fluorescence phenomena setting a method based on microscopy techniques. Our research has been conducted in three stages:

- a) General identification of the main elements in the dermis, characterization of the iridophores and their spatial arrangement in the *stratum spongiosum* using transmission electron micrographs.
- b) Analysis of skin samples exhibiting varying distribution patterns of iridophores using optical microscopy micrographs.
- c) Finding of the iridophores fluorescence using a fluorescence microscope and measurement of their emission spectrum using a confocal microscope.

Material

The investigated specimens (*R. temporaria*) belong to the collection of the Animal Anatomy Laboratory Foundation. Our team captured them during summer research campaigns (performed in August) in the Central Pyrenees (Iberian slope). We have sorted the specimens based on their SVL (snout-vent length, [cm]): large frogs are those with $SVL \geq 5$ cm and small frogs are those with $SVL \leq 3.5$ cm. All small frogs captured for this study were located close to ponds surrounded by dense vegetation, which is a more humid environment than the capture sites for larger frogs. We have selected five frogs (see Table 1) to obtain nine skin samples carved with a knife (1 mm x 3 mm) as source material for our experiments. We have processed them in the facilities available in the electron microscopy department in C.A.C.T.I. (Technological and Scientific Support Center for Research, Vigo University).

Table 1

Skin sample preparation

The skin sample preparation was performed in three steps: a) Fixation of the tissues, b) Inclusion of the sample in a resin block, c) Cutting of the blocks and processing of the sections.

a) Fixation process. The skin fragments were rehydrated in an ethanol series (90, 80, 70, 50, 30, and 15%) during 30 min for each dilution at 4° C. We have adapted the standard protocol set by Bagnara et al. (1968) for our experimental protocol: The tissues were fixed using 6% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h and 2% osmium tetroxide in the same buffer for 5 h. After fixation, we proceeded to dehydration in an ethanol series (50, 75, 90, 95, and 100%) during 2 h for each dilution at 4° C. During this process, the pteridines (yellow pigments) dissolve and are removed from the chromatophores (Bagnara 1966, 1976; Frost and Robinson 1984; Bagnara et al. 2007).

b) Inclusion in resin blocks. The skin samples were immersed in ascending series of Epon resin diluted in propylene oxide (1:3 v/v, 1:1 v/v, 3:1 v/v) during 2 h each dilution (3 times each) at 4° C, stirring rotor was assembled. Afterwards, they were embedded in pure Epon during 3 h at room temperature (using stirring rotor) and during 30 min at 60° C. Finally, we have polymerized the samples for 48 h at 60° C.

c) Processing of the resin blocks. We cut semithin cross sections (0.70 µm) from the nine resin blocks (E1-1, E2-1, E3-1, E3-2, E3-3, E4-1, E4-2, E5-1 y E5-2) using a Reichert Ultracut S ultramicrotome with a glass knife. These semithin sections were stained with methylene blue to be observed with light microscopy. We have preserved from methylene blue some samples obtained from block E5-2 for observation by

confocal and fluorescence microscopy. This sample preparation protocol preserves the guanine crystals (Bagnara et al. 1968; Saenko et al. 2013; Teyssier et al. 2015). We chose the E5-1 block to perform transmission electron microscopy (TEM) experiments. First, we have observed the semithin sections using a Nikon E800 light microscope to determine the preferred area for TEM observation. Next, we have cut ultrathin cross sections (70-90 nm) of the selected area using a Reichert Ultracut S ultramicrotome with a diamond knife. The ultrathin sections have been mounted on Formvar-coated grids and contrasted with 0.5% aqueous uranyl acetate, for 30 min at 7° C and lead citrate prepared according to Reynolds (1963) for 20 min at 7° C using an automatic Leica EM AC20 system. The guanine crystals were dissolved and removed during contrast with uranyl acetate and lead citrate, leading to visibility of the empty areas they formerly occupied (Saenko et al. 2013; Teyssier et al. 2015).

Transmission Electron Microscopy (TEM): Characterization of iridophores in *R. temporaria*

The ultrathin sections samples from E5-1 block were examined using a JEOL JEM 1010 transmission electron microscope at 100 kV equipped with an Orius-Digital Montage Plug-in CCD camera (Gatan Inc.) and were photographed using the Gatan Digital Micrograph software (Gatan Inc.).

Light microscopy: Distribution patterns of iridophores

We have examined semithin sections samples stained with methylene blue using a Nikon Eclipse E800 optical microscope and we have photographed them with a Nikon DS-U2 CCD camera.

We have analyzed the distribution patterns of iridophores as a function of distinct factors: location of study area (altitude [m a. s. l.], locality and coordinates), characteristics of the sampling site (glacial lakes, springs and streams) and average daily

maximum atmospheric temperature during the sampling month ($T_{\max}$ [$^{\circ}$ C], August). We also considered the characteristics of skin samples in the specimens studied: size of the frog (SVL, [cm]), skin area (dorsal, ventral) and presence or absence of dark melanistic spots (see Table 1).

We have measured an average of seven skin areas ($a = 0.0062 \text{ mm}^2$; $b = 0.05 \text{ mm}$; $h = 0.123 \text{ mm}$ where b is the length of the sample and h is the mean depth) using each of the optical micrographs taken from samples (E1-1, E2-1, E3-1, E3-2, E3-3, E4-1, E4-2, E5-1 and E5-2). We have counted the number of iridophores at selected skin areas and calculated the average number of iridophores per 0.0062 mm^2 (density of iridophores) (see Table 2). We have analyzed the optical micrographs using ImageJ software (Schneider et al. 2012). We have identified a total 1960 iridophores belonging to 71 areas.

We calculated the percentage increments in iridophores density in relation to the studied factors and then analyzed how these factors affect iridophores distribution patterns (see Table 3).

Fluorescence and confocal microscopy: Study of the fluorescence of iridophores

Prior to the observation, we have removed the pteridines from the sample (see above), since Taboada et al. (2017), during research of the frog *Scinax nasicus* (Amphibia, Anura, Hylidae), observed in a semithin section that the pteridines of the xanthophores emit fluorescence. The elimination of these pigments allows us to attribute the fluorescence, if detected, exclusively to the iridophores present in the sample.

Firstly, we have examined semithin sections of the E5-2 block using an Epi-Fluorescence module of a Nikon Eclipse E800 optical microscope with three excitation sources: UV; blue; green and red. Secondly, we have examined these sections with a Leica SP5 Confocal Optical Microscope to characterize the fluorescence emission

spectrum of the iridophores. We have excited the samples with three different laser sources at eight frequencies: UV diode at $\lambda_{\text{laser}} = 405$ nm (Ben-Zvi et al. 2015), Argon laser in the spectra from blue to yellow ($\lambda_{\text{laser}} = 458, 476, 488, 496,$ and 514 nm) and Helium-Neon lasers in the green and red spectrum ($\lambda_{\text{laser}} = 543,$ and 633 nm). We have imaged the fluorescence of the iridophores and in order to represent graphically their emission spectrum we have processed the images using the Metamorph Image Analysis Software (Molecular Devices LLC, San José, CA).

Results

Observation and description of iridophores ultrastructure in *R. temporaria* using TEM

Fig. 1

The TEM micrograph is a cross section of the dorsal skin of *R. temporaria* (Fig. 1) that shows the *stratum spongiosum* of the dermis. In the image, we can observe two large rounded shape iridophores (ir1 and ir2) and its nuclei (nc). The observed bright areas are the empty spaces previously occupied by the reflecting platelets (es) and are surrounded by the cytoplasm (ci); they can be detected because their guanine crystals have been dissolved during sample processing (see above). Extended melanophores processes (me) can be observed enveloping the iridophores. Well-defined muscle fibers (fm) surrounding the iridophores are observed in an upward direction to the epidermis. The main structure of the reflecting platelets is rectangular shaped and it is arranged in groups, which exhibit various directions regarding the skin surface: in parallel, oblique and perpendicular angles. During our TEM observations, we found that the iridophores are very numerous (see below) being distributed throughout the *stratum spongiosum* in layers arrangement. The layer thickness varies from single to multiple cells. These

results are in agreement with optical microscopy observations as shown in the Fig. S1 (Online Resource).

Iridophores distribution as a function of distinct variables using optical microscopy

We identified four factors that affect iridophores distribution patterns: frog size (SVL), altitude, skin area (dorsal and ventral), and the presence or absence of dark melanistic spots (Table 2).

Table 2

We expressed the variation in iridophores density between peers of skin samples as percentage increments (Table 3), allowing us to analyze the effect of these factors in iridophores distribution. It is important to keep in mind that some of the investigated factors show correlation with the sampling sites and the average daily maximum temperature.

Table 3

We observed the effect of frog size (SVL) comparing the samples E1-1 and E4-2. These samples belong to skin areas without dark melanistic spots in frogs inhabiting a similar type of location and altitude. Iridophores density increases by 28.89% with increasing frog size. We compared the effect of altitude on the samples E1-1 and E3-2. These samples belong to skin areas without dark melanistic spots in frogs of similar size and inhabiting a similar type of location. Iridophores density increases with altitude by 45.87%. Ventral and dorsal skin areas have different iridophores distribution patterns.

We compared the ventral and dorsal areas in samples E3-3 and E3-2. These samples belong to skin areas without dark melanistic spots in the same frog. The density of iridophores increases by 51.43% in the dorsal area compared to the ventral area. We analyzed the effect of the presence or absence of dark melanistic spots by comparing the

skin areas two by two in frogs of similar size and inhabiting a similar type of location at similar altitude. We compared the following pairs of samples: E3-1 and E3-2, E4-1 and E4-2, and E5-1 and E5-2. We observed that the density of iridophores increases from 11.97 to 17.57% in areas with absence spots compared to areas with the presence of dark melanistic spots.

Fluorescence study in iridophores

We detected fluorescence emission in the iridophores of semithin sections of the dorsal skin of *R. temporaria* when exposed to UV spectrum. We performed the same experiment under other light excitation sources (blue, green and red) and did not detect fluorescence emission. The dark melanophores absorb in the whole radiation spectrum. Confocal images of an unstained semithin section of the dorsal skin of *R. temporaria* show bright blue fluorescence emission in the iridophores of the skin exposed to UV light ($\lambda_{\text{laser}} = 405 \text{ nm}$) as we see in the Fig. S2 (Online Resource). Unstained semithin cross section of dorsal skin superimposed to confocal images confirms that iridophores emit fluorescence (Fig. 2). We did not observe fluorescence in any other structures present in this section, including iridophores nuclei and melanophores.

Fig. 2

The emission spectrum of iridophores revealed that excitation at 405 nm caused emission of fluorescence in the blue visible spectrum in the range from 440 to 520 nm (Fig. 3). Under other laser excitation sources, we did not detect any fluorescent signals.

Fig. 3

Discussion

Characterization of the main elements of the dermis, the spatial arrangement of the iridophores and their protective functionality

The iridophores of *R. temporaria* skin are cells formed by a large nucleus and reflecting platelets composed of guanine crystals. Those crystals are represented by numerous white spaces dissolved and removed from the sample during the contrasting process prior to observation as described by Saenko et al. (2013) and Teyssier et al. (2015). The ultrastructure of the iridophores described in this study agrees to other observations in amphibians (Bagnara 1966; Bagnara et al. 1968; Taylor 1969; Bagnara 1976; Frost and Robinson 1984; Kobelt and Linsenmair 1986). Also in other animals such as reptiles (Morrison 1995; Saenko et al. 2013; Teyssier et al. 2015; Kuriyama et al. 2017), fish (Fujii 1993; Khoo et al. 2014; Goda 2017), mollusks (Holt et al. 2014; Rossbach et al. 2020), copepods (Gur et al. 2016), etc. The melanophores processes extensions surround the iridophores according to observations in amphibians by Bagnara et al. (1968), Taylor (1969) and Bagnara (1976). The muscle fibers are in an upward direction towards the epidermis and overlapping the chromatophores as observed in other amphibians (Elkan 1968; Duellman and Trueb 1994; Greven et al. 1995).

The reflecting platelets, generally rectangular and arranged in groups, have different tilt angles as described in other amphibians (Taylor 1969; Bagnara 1976; Nielsen and Dick 1978; Frost and Robinson 1984; Kobelt and Linsenmair 1986). The variation in the tilt angles determines the nature of the pigmentary function in the iridophores.

The iridophores are numerous and stacked in various cell layers, the same phenomenon has been observed in some African frogs from arid environments: the savannah frog *H. viridiflavus* doubles its iridophores number to adapt to the dry season (Kobelt and Linsenmair 1986; Lampert and Linsenmair 2002) and the steppe frog *Chiromantis petersi* (Rhacophoridae) has several layers of iridophores. These reported adaptations in arid climates represent mechanisms to avoid evaporative water loss (EWL) (Drewes et al. 1977; Kobelt and Linsenmair 1986).

On the other hand, arctic-alpine distribution of identical plant and animal species has been reported by other authors (Schmitt et al. 2010) including some populations of *R. temporaria* (Cogălniceanu et al. 2018), target species of our study, this is due to the similar and / or necessary conditions during their active life so in arctic as in alpine regions. Polar terrestrial environments have been described as deserts (Kennedy 1993; Ayres et al. 2010), the distribution of organisms in both places is correlated with humidity (Kennedy 1993) and therefore with the EWL. EWL depends solely on environmental variables, especially on relative humidity (Katz and Graham 1980). Comparing the *R. temporaria* iridophores with other studied specimens we conclude that their ultrastructure is similar to most of the amphibians, however their number and spatial arrangement in the dermis correspond to anurans from arid areas. This is due to the fact that the high mountain Pyrenean habitats are alpine domain areas which imply large circadian thermal oscillations (Oromi et al. 2015; Enriquez-Urzelai et al. 2020), an increasing of UV radiation with altitude (Marquis et al. 2008) and a very low relative humidity during the day (Duane et al. 2008). All together, these atmospheric conditions during August (period of the year when we captured the studied specimens) present similar atmospheric conditions to arid environments like the African savannas and the arctic environments.

In second place, comparing the iridophores number between *R. temporaria* with other anurans such as *Agalychnis dachnicolor* (Phyllomedusidae), *Bombina orientalis* (Bombinatoridae), *Hyla arenicolor* and *Hyla cinerea* (Hylidae), *R. pipiens* and *R. japonica* (Ranidae) (Bagnara 1976; Frost and Robinson 1984; Sumida et al. 2016; Frost 2021) shows *R. temporaria* to have a higher iridophores number than the other reported frogs. Taking into account that the target species inhabits the alpine level and the arctic regions and as well as the arrangement and iridophores number in the reported frogs

from arid areas, we can connect the high mountain alpine environments, the arctic and the desert environments. All these habitats have a common factor, which is a low relative humidity during its active life period causing a great EWL.

We conclude that the presence of a large iridophores number is an adaptation of the *R. temporaria* to avoid the EWL, allowing it to adapt to arid high mountain or arctic environments located at the limits of its European distribution.

Distribution patterns of iridophores

R. temporaria modifies the density of iridophores according to different factors. Dorsal skin rises iridophores density with increasing frog size, as described in the African savannah frog *H. viridiflavus* Kobelt and Linsenmair (1986). Small frogs in our study area do not get away from ponds surrounded by dense vegetation. They live in very humid environments and this fact allows them to keep a lower iridophores number in relation to the larger frogs. These ones move far away from the wetlands and have to avoid the EWL.

The iridophores density increases almost 50% (45.87%) when ascending approximately 500 m a. s. l. At higher altitudes, the relative humidity decreases and the UV radiation increases. Both variables influence the EWL. Increasing the presence of iridophores allows the EWL to decrease because it implies an increasing reflection of solar radiation through iridophores (Tracy 1976; Tattersall et al. 2006).

One can see how the dorsal skin increases strongly the density of iridophores when compared to ventral skin, as described in the frog *H. viridiflavus* by Kobelt and Linsenmair (1986). The ventral skin is always in contact with the humid substrate and does not receive direct sunlight so it does not need much protection against the EWL. Iridophores density decreases with the presence of dark melanistic spots compared to unspotted areas, as reported in the following amphibians *Bombina orientalis*, *Oophaga*

sp. (*Dendrobatidae*), *Ptychadena mascareniensis* (*Ptychadenidae*), *R. clamitans* and *R. pipiens* (*Ranidae*) by Smith-Gill et al. (1972), Richards and Nace (1983), Frost and Robinson (1984), Posso-Terranova and Andrés (2017) and Frost (2021).

Dark melanistic spots in *R. temporaria* have a mimetic role (Dawes 1941) and they are due to phenotypic plasticity phenomena not related to environmental variables such as altitude (Alho et al. 2010). Increasing the surface of melanistic spots decreases the iridophores number. Considering that individuals with melanistic patterns reach higher temperatures when exposed to solar radiation (Vences et al. 2002; Clusella-Trullas et al. 2007), we can conclude that these melanistic patterns are limited by low relative humidity and by UV radiation, and there is an existing balance between EWL and mimicry which limits the variability of melanistic patterns.

In view of the above, we can affirm that there is correlation between the rising in the iridophores density and the environmental factors leading to lower relative environmental humidity, therefore we can establish that iridophores are a protection mechanism against EWL.

Fluorescence of iridophores as a UV photoprotection mechanism

Iridophores in the skin of *R. temporaria* emit blue fluorescence under UV light excitation. Guanine crystals of the reflecting platelets cause fluorescence emission. Cells nuclei do not present fluorescence emission and one can distinguish them from the rest of the cell. Iridophores fluorescence only takes place under UV light excitation; this allows us to conclude that iridophores are specialized structures on dispelling this type of radiation.

The iridophores UV emission spectrum ($\lambda_{\text{laser}} = 405 \text{ nm}$) of the skin sample, almost all the UV radiation is absorbed and energy emission takes place in the range of 440 to 520 nm. Other authors have observed the same phenomenon in tissues formed by guanine

iridophores in the giant clam, *Tridacna maxima*, presenting an emission spectrum at $\lambda =$ 325 nm in a range from 391 to 530 nm (Rossbach et al. 2020), this phenomenon is interpreted as a photoprotection mechanism.

We conclude that the fluorescence of iridophores is a photoprotection mechanism against UV radiation.

Conclusions

We have successfully achieved the aim of this work since using modern microscopy techniques we have demonstrated the protective function of iridophores in *R. temporaria* against EWL.

Experiments demonstrating the fluorescence of iridophores are indicators for the specific photoprotection mechanism through UV radiation dispelling which allows to avoid tissue damages and to prevent skin overheating.

The conclusions of this study are innovative because we report for first time iridophores fluorescence in amphibian skin and we demonstrate that increasing the iridophores number represents a photoprotective adaptation mechanism that allows the species to adapt to arid high mountain or arctic environments located at the limits of their European distribution.

Data availability statement

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval

Ethics approval was not required for this study according to local legislation General Directorate of the Natural Environment of the Diputación General de Aragón.

Consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Code availability

Not applicable.

Authors' contributions

LCC, PCC and APS conceived and designed the experiment. LCC performed the experiments. LCC, PCC and APS analyzed the data and wrote the manuscript.

Acknowledgments

The Animal Anatomy Laboratory Foundation (2020-001) supported this project. We thank Ursicino Abajo, warden of the Respomuso mountain refuge, for his logistic and gastronomic support. We thank the General Directorate of the Natural Environment of the Diputación General de Aragón kindly issued research in frogs permits for the Pyrenees area.

References

Alho JS, Herczeg G, Söderman F et al (2010) Increasing melanism along a latitudinal gradient in a widespread amphibian: Local adaptation, ontogenic or environmental plasticity? BMC Evol Biol 10:317. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-317>

408 Assenza SP, Brown PR (1984) Ultraviolet and fluorescence characterization of purines
 409 and pyrimidines by post-column pH manipulation. J Chromatogr 289:355-365.
 410 [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)95101-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)95101-X)
 411 Ayres E, Nkem JN, Wall DH et al (2010) Experimentally increased snow accumulation
 412 alters soil moisture and animal community structure in a polar desert. Polar Biol
 413 33:897-907. <https://doi.org/10.1007/s00300-010-0766-3>
 414 Bagnara JT (1966) Cytology and Cytophysiology of Non-Melanophore Pigment Cells.
 415 Int Rev Cytol 20:73-205. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60801-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60801-3)
 416 Bagnara JT, Taylor JD, Hadley ME (1968) The dermal chromatophore unit. J Cell Biol
 417 38:67-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.38.1.67>
 418 Bagnara JT (1976) Color change. In: Lofts B (ed) Physiology of the Amphibia, Vol 3.
 419 Academic Press, New York, pp 1-52
 420 Bagnara JT, Matsumoto J (2006) Comparative Anatomy and Physiology of Pigment
 421 Cells in Nonmammalian Tissues. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ et al (eds)
 422 The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology, 2nd edn. Blackwell
 423 Publishing Ltd, Oxford, pp 11-59
 424 Bagnara JT, Fernandez PJ, Fujii R (2007) On the blue coloration of vertebrates.
 425 Pigment Cell Res 20:14-26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00360.x>
 426 Ben-Zvi O, Eyal G, Loya Y (2015) Light-dependent fluorescence in the coral *Galaxea*
 427 *fascicularis*. Hydrobiologia 759:15-26. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2063-6>
 428 Centeno FC, Antoniazzi MM, Andrade DV et al (2015) Anuran skin and basking
 429 behavior: The case of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956). J
 430 Morphol 276:1172-1182. <https://doi.org/10.1002/jmor.20407>
 431 Clusella-Trullas S, van Wyk JH, Spotila JR (2007) Thermal melanism in ectotherms. J
 432 Therm Biol 32:235-245. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.013>

433 Cogălniceanu D, Dorel R, Plăiașu R, Palmer MW (2018) Out in the cold: Trophic
434 resource use by the common frog (*Rana temporaria*) populations inhabiting extreme
435 habitats. Ann Zool Fennici 55:257-275. <https://doi.org/10.5735/086.055.0608>
436 Dawes B (1941) The melanin content of the skin of *Rana temporaria* under normal
437 conditions and after prolonged light- and dark-adaptation. A photometric study. J Exp
438 Biol 18:26-49
439 Drewes RC, Hillman SS, Putnam RW, Sokol OM (1977) Water, nitrogen and ion
440 balance in African treefrog *Chiromantis petersi boulenger* (Anura: Rhacophoridae),
441 with comments on the structure of the integument. J Comp Physiol B 116:257-267.
442 <https://doi.org/10.1007/BF00689035>
443 Duane WJ, Pepin NC, Losleben ML, Hardy DR (2008) General characteristics of
444 temperature and humidity variability on Kilimanjaro, Tanzania. Arct Antarct Alp Res
445 40:323-334. [https://doi.org/10.1657/1523-0430\(06-127\)\[DUANE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1657/1523-0430(06-127)[DUANE]2.0.CO;2)
446 Duellman WE, Trueb L (1994) Integument. In: The Johns Hopkins University Press
447 (ed) Biology of Amphibians. Baltimore, London, pp 367-378
448 Elkan E (1968) Mucopolysaccharides in anuran defence against desiccation. J Zool
449 155:19-53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1968.tb03028.x>
450 Enriquez-Urzelai U, Tingley R, Kearney MR et al (2020) The roles of acclimation and
451 behaviour in buffering climate change impacts along elevational gradients. J Anim Ecol
452 89:1722-1734. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13222>
453 Frost SK, Robinson SJ (1984) Pigment cell differentiation in the fire-bellied toad,
454 *Bombina orientalis*. I. Structural, chemical, and physical aspects of the adult pigment
455 pattern. J Morphol 179:229-242. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051790303>
456 Frost DR (2021) Amphibian Species of the World: an Online Reference, V6.1.
457 American Museum of Natural History, New York, USA.

458 <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php> Accessed on 10-02-2021.

459 <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>

460 Fujii R (1993) Cytophysiology of fish chromatophores. *Int Rev Cytol* 143:191-255.

461 [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61876-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61876-8)

462 Gasc JP, Cabela A, Crnobrnja-Isailovic J et al (1997) Atlas of amphibians and reptiles

463 in Europe, Collection Patrimoines Naturels, Vol 29. Societas Europaea Herpetologica,

464 Muséum National d'Histoire Naturelle et Service du Patrimoine Naturel, Paris

465 Giuliani P, Zuccarini M, Buccella S et al (2016) Development of a new HPLC method

466 using fluorescence detection without derivatization for determining purine nucleoside

467 phosphorylase activity in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life*

468 *Sci* 1009-1010:114-121. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.012>

469 Goda M (2017) Rapid integumental color changes due to novel iridophores in the

470 chameleon sand tilefish *Hoplolatilus chlupatyi*. *Pigment Cell Melanoma Res* 30:368-

471 371. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12581>

472 Greven H, Zanger K, Schwinger G (1995) Mechanical properties of the skin of *Xenopus*

473 *laevis* (Anura, Amphibia). *J Morphol* 224:15-22.

474 <https://doi.org/10.1002/jmor.1052240103>

475 Gur D, Leshem B, Farstey V et al (2016) Light-Induced Color Change in the

476 Sapphirinid Copepods: Tunable Photonic Crystals. *Adv Funct Mater* 26:1393-1399.

477 <https://doi.org/10.1002/adfm.201504339>

478 Holt AL, Vahidinia S, Gagnon YL et al (2014) Photosymbiotic giant clams are

479 transformers of solar flux. *J R Soc Interface* 11:20140678.

480 <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0678>

481 Huxley AF (1968) A theoretical treatment of reflexion of light by multilayer structures.

482 *J Exp Biol* 48:227-245

483 Katz U, Graham R (1980) Water relations in the toad (*Bufo viridis*) and a comparison
484 with the frog (*Rana ridibunda*). Comp Biochem Physiol 67A:245-251.
485 [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(80\)90270-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(80)90270-4)

486 Kennedy AD (1993) Water as a limiting factor in the Antarctic terrestrial environment:
487 A biogeographical synthesis. Arct Alp Res 25:308-315. <https://doi.org/10.2307/1551914>

488 Khogali A, Al-Bar OF (1992) A study of solar ultraviolet radiation at Makkah solar
489 station. Sol Energy 48:79-87. [https://doi.org/10.1016/0038-092X\(92\)90036-A](https://doi.org/10.1016/0038-092X(92)90036-A)

490 Khoo G, Lim TM, Phang VPE (2014) Cellular Basis of Metallic Iridescence in the
491 Siamese Fighting Fish, *Betta splendens*. Israeli J Aquacul-Bamidgeh 66(988)

492 Kobelt F, Linsenmair KE (1986) Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus*
493 (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. I. The skin of *Hyperolius*
494 *viridiflavus nitidulus* in wet and dry season conditions. Oecologia 68:533-541.
495 <https://doi.org/10.1007/BF00378768>

496 Kobelt F, Linsenmair KE (1992) Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus*
497 (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. VI. The iridophores in the
498 skin as radiation reflectors. J Comp Physiol B 162:314-326.
499 <https://doi.org/10.1007/BF00260758>

500 Kuriyama T, Esashi J, Hasegawa M (2017) Light reflection from crystal platelets in
501 iridophores determines green or brown skin coloration in *Takydromus* lizards. Zoology
502 121:83-90. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.11.003>

503 Lamb JY, Davis MP (2020) Salamanders and other amphibians are aglow with
504 biofluorescence. Sci Rep 10:2821. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59528-9>

505 Lampert KP, Linsenmair KE (2002) Alternative life cycle strategies in the West African
506 reed frog *Hyperolius nitidulus*: the answer to an unpredictable environment? Oecologia
507 130:364-372. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0821-4>

508 Land MF (1972) The physics and biology of animal reflectors. Prog Biophys Mol Biol
509 24:75-106. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(72\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0079-6107(72)90004-1)

510 Ligon RA, McCartney KL (2016) Biochemical regulation of pigment motility in
511 vertebrate chromatophores: a review of physiological color change mechanisms. Curr
512 Zool 62:237-252. <https://doi.org/10.1093/cz/zow051>

513 Marquis O, Miaud C, Lena JP (2008) Developmental responses to UV-B radiation in
514 common frog *Rana temporaria* embryos from along an altitudinal gradient. Popul Ecol
515 50:123-130. <https://doi.org/10.1007/s10144-007-0071-3>

516 Morrison RL (1995) A transmission Electron-Microscopic (TEM) method for
517 determining structural colors reflected by lizard iridophores. Pigment Cell Res 8:28-36.
518 <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1995.tb00771.x>

519 Nielsen HI, Dyck J (1978) Adaptation of tree frog, *Hyla cinerea*, to colored
520 backgrounds, and the role of the three chromatophore types. J Exp Zool 205:79-94.
521 <https://doi.org/10.1002/jez.1402050111>

522 Oromi N, Camarasa S, Sanuy I, Sanuy D (2015) Variation of growth rate and survival
523 in embryos and larvae of *Rana temporaria* populations from the Pyrenees. Acta
524 Herpetol 10:85-91. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-16297

525 Posso-Terranova A, Andrés JA (2017) Diversification and convergence of aposematic
526 phenotypes: truncated receptors and cellular arrangements mediate rapid evolution of
527 coloration in harlequin poison frogs. Evolution (N Y) 71:2677-2692.
528 <https://doi.org/10.1111/evo.13335>

529 Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in
530 electron microscopy. J Cell Biol 17:208-212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>

531 Richards CM, Nace GW (1983) Dark pigment variants in Anurans: Classification, new
 532 descriptions, color changes and inheritance. *Copeia* 4:979-990.
 533 <https://doi.org/10.2307/1445100>
 534 Rollins-Smith LA (2017) Amphibian immunity-stress, disease, and climate change. *Dev*
 535 *Comp Immunol* 66:111-119. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.002>
 536 Rossbach S, Subedi RC, Ng TK et al (2020) Iridocytes Mediate Photonic Cooperation
 537 Between Giant Clams (Tridacninae) and Their Photosynthetic Symbionts. *Front Mar Sci*
 538 7:465. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00465>
 539 Saenko SV, Teyssier J, van der Marel D, Milinkovitch MC (2013) Precise
 540 colocalization of interacting structural and pigmentary elements generates extensive
 541 color pattern variation in *Phelsuma* lizards. *BMC Biol* 11:105.
 542 <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-105>
 543 Schmitt T, Muster C, Schönswetter P (2010) Are Disjunct Alpine and Arctic-Alpine
 544 Animal and Plant Species in the Western Palearctic Really "Relics of a Cold Past"? In:
 545 Habel JC, Assmann T (eds) *Relict Species*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 239-252
 546 Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of
 547 image analysis. *Nat Methods* 9:671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
 548 Smith-Gill SJ, Richards CM, Nace GW (1972) Genetic and metabolic bases of two
 549 "albino" phenotypes in leopard frog, *Rana pipiens*. *J Exp Zool* 180:157-167.
 550 <https://doi.org/10.1002/jez.1401800203>
 551 Sommaruga R, Psenner R (1997) Ultraviolet radiation in a high mountain lake of the
 552 Austrian Alps: Air and underwater measurements. *Photochem Photobiol* 65:957-963.
 553 <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb07954.x>
 554 Sommaruga R (2001) The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *J*
 555 *Photochem Photobiol B Biol* 62:35-42. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00154-3)

556 Sumida M, Islam MM, Igawa T et al (2016) The first see-through frog created by
557 breeding: description, inheritance patterns, and dermal chromatophore structure. Sci
558 Rep 6:24431. <https://doi.org/10.1038/srep24431>

559 Taboada C, Brunetti AE, Pedron FN et al (2017) Naturally occurring fluorescence in
560 frogs. Proc Natl Acad Sci U S A 114:3672-3677.
561 <https://doi.org/10.1073/pnas.1701053114>

562 Tattersall GJ, Eterovick PC, de Andrade DV (2006) Tribute to R.G. Boutilier: Skin
563 colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai*
564 (Bokermann 1956). J Exp Biol 209:1185-1196. <https://doi.org/10.1242/jeb.02038>

565 Taylor JD (1969) The effects of intermedin on the ultrastructure of Amphibian
566 iridophores. Gen Comp Endocrinol 12:405-416. [https://doi.org/10.1016/0016-](https://doi.org/10.1016/0016-6480(69)90157-9)
567 [6480\(69\)90157-9](https://doi.org/10.1016/0016-6480(69)90157-9)

568 Teyssier J, Saenko SV, van der Marel D, Milinkovitch MC (2015) Photonic crystals
569 cause active colour change in chameleons. Nat Commun 6:6368.
570 <https://doi.org/10.1038/ncomms7368>

571 Tracy CR (1976) A model of dynamic exchanges of water and energy between a
572 terrestrial amphibian and its environment. Ecol Monogr 46:293-326.
573 <https://doi.org/10.2307/1942256>

574 Udenfriend S, Zaltzman P (1962) Fluorescence characteristics of purines, pyrimidines,
575 and their derivatives: Measurement of guanine in nucleic acid hydrolyzates. Anal
576 Biochem 3:49-59. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90043-X)

577 Vences M, Galán P, Vieites DR et al (2002) Field body temperatures and heating rates
578 in a montane frog population: the importance of black dorsal pattern for
579 thermoregulation. Ann Zool Fennici 39:209-220
580

Table 1 Characteristics of the study area and skin samples in five specimens belonging to *Rana temporaria*. Sampling site and average maximum daily atmospheric temperature during August ($T_{\max}$, [° C]). Altitude (meters above the sea level [m a. s. l.]). Location of study area. Snout-vent length (SVL) [$SVL \geq 5$ cm (B), $SVL \leq 3.5$ cm (S)]. Skin sample key (Id). Skin area [dorsal (D), ventral (V)]. Dark melanistic spots [presence (Y), absence (N)].

Sampling site	Location of study area			Samples				
	Altitude [m a. s. l.]	Locality	Coordinates	Frog	SVL	Id	Skin area	Dark melanistic Spots
Glacial lakes (17.3° C)	2130	Ibón de las ranas	42° 48'	E1	S	E1-1	D	N
			48.8880" N,	E4	B	E4-1	D	Y
			0° 16'			E4-2	D	N
			54.8280" W					
	2223	Lagos de Anayet	42° 46'	E2	S	E2-1	D	Y
			36.0480" N,					
			0° 26'					
			34.1700" W					
	2564	Hoyas de Brazato	42° 44'	E3	S	E3-1	D	Y
			37.5060" N,			E3-2	D	N
			0° 12'			E3-3	V	N
			54.6720" W					
Springs and streams (21.8° C)	1794	Charcas de	42° 47'	E5	S	E5-1	D	Y
		Formigal	6.5400" N,			E5-2	D	N
		climbing	0° 23'					
		to Anayet	59.6520" W					

Table 2 Density of iridophores corresponding to skin samples belonging to five specimens of *R. temporaria*. Sampling site and average maximum daily atmospheric temperature during August ($T_{\max}$, [° C]). Altitude (meters above the sea level [m a. s. l.]). Snout-vent length (SVL) [$SVL \geq 5$ cm (B), $SVL \leq 3.5$ cm (S)]. Skin sample key (Id). Skin area [dorsal (D), ventral (V)]. Dark melanistic spots [presence (Y), absence (N)]. Density of iridophores (Di) is the average number of iridophores per 0.0062 mm².

Sampling site	Altitude	Frog	SVL	Id	Skin	Dark	Di
(T _{max} ° C)	[m a. s. l.]				area	melanistic spots	
Glacial lakes (17.3° C)	2130	E1	S	E1-1	D	N	21.8
		E4	B	E4-1	D	Y	23.9
				E4-2	D	N	28.1
	2223	E2	S	E2-1	D	Y	27.1
	2564	E3	S	E3-1	D	Y	28.4
				E3-2	D	N	31.8
			E3-3	V	N	21.0	
Springs and streams (21.8° C)	1794	E5	S	E5-1	D	Y	30.7
				E5-2	D	N	35.6

Table 3 Influence factors for iridophores distribution pattern. Skin sample key (Id). Percentage calculated as increment in the iridophores density between peers of skin samples. Percentage increments (Pi), [%] [$Pi = 100(b-a)/a$].

Factors	Id	Pi [%]
Frog size (SVL)	E1-1 vs E4-2	28.89
Altitude [m a. s. l]	E1-1 vs E3-2	45.87
Skin area	E3-3 vs E3-2	51.43
Dark melanistic spots	E3-1 vs E3-2	11.97
	E4-1 vs E4-2	17.57
	E5-1 vs E5-2	15.96

Figure captions

Fig. 1 Representative electron micrograph of the iridophores immersed in the *stratum spongiosum* of *Rana temporaria* skin. It shows: two iridophores (ir1 and ir2) and their nuclei (nc), the empty areas (es) originated after removal of the crystalline reflecting platelets during the contrasting process, cytoplasm (ci), melanophores processes extensions (me) and muscle fibers (fm). Bar = 5µm

Fig. 2 Unstained semithin cross section of dorsal skin of *Rana temporaria* superimposed to confocal image excited with a 405 nm laser beam. One can see the iridophores (ir) emitting bright blue fluorescence and the dark melanophores. Bar = 100 µm

Fig. 3 Emission spectrum of iridophores from *Rana temporaria* skin section. X-axis represents wavelength [nm] of the radiation emitted in the 440 to 520 nm bandwidth by iridophores excited with UV radiation source at 405 nm

Fig. 1

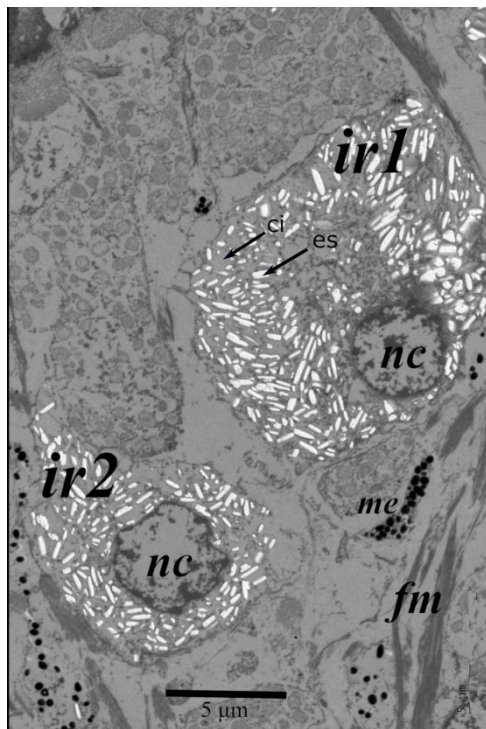


Fig. 2

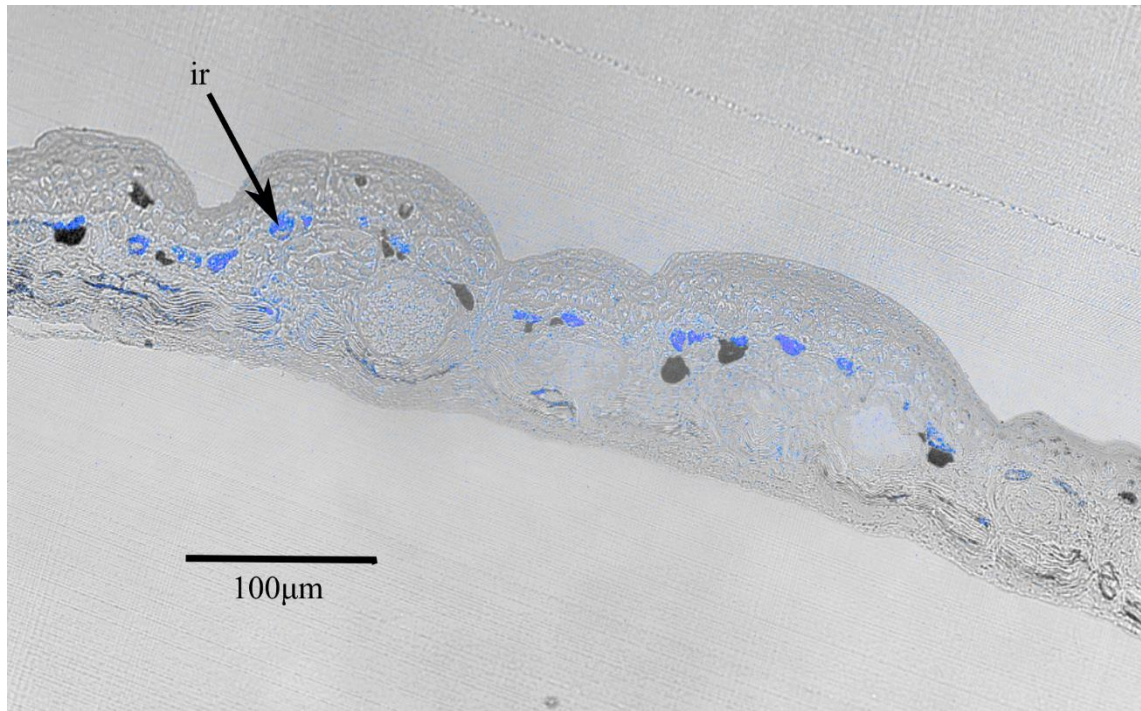
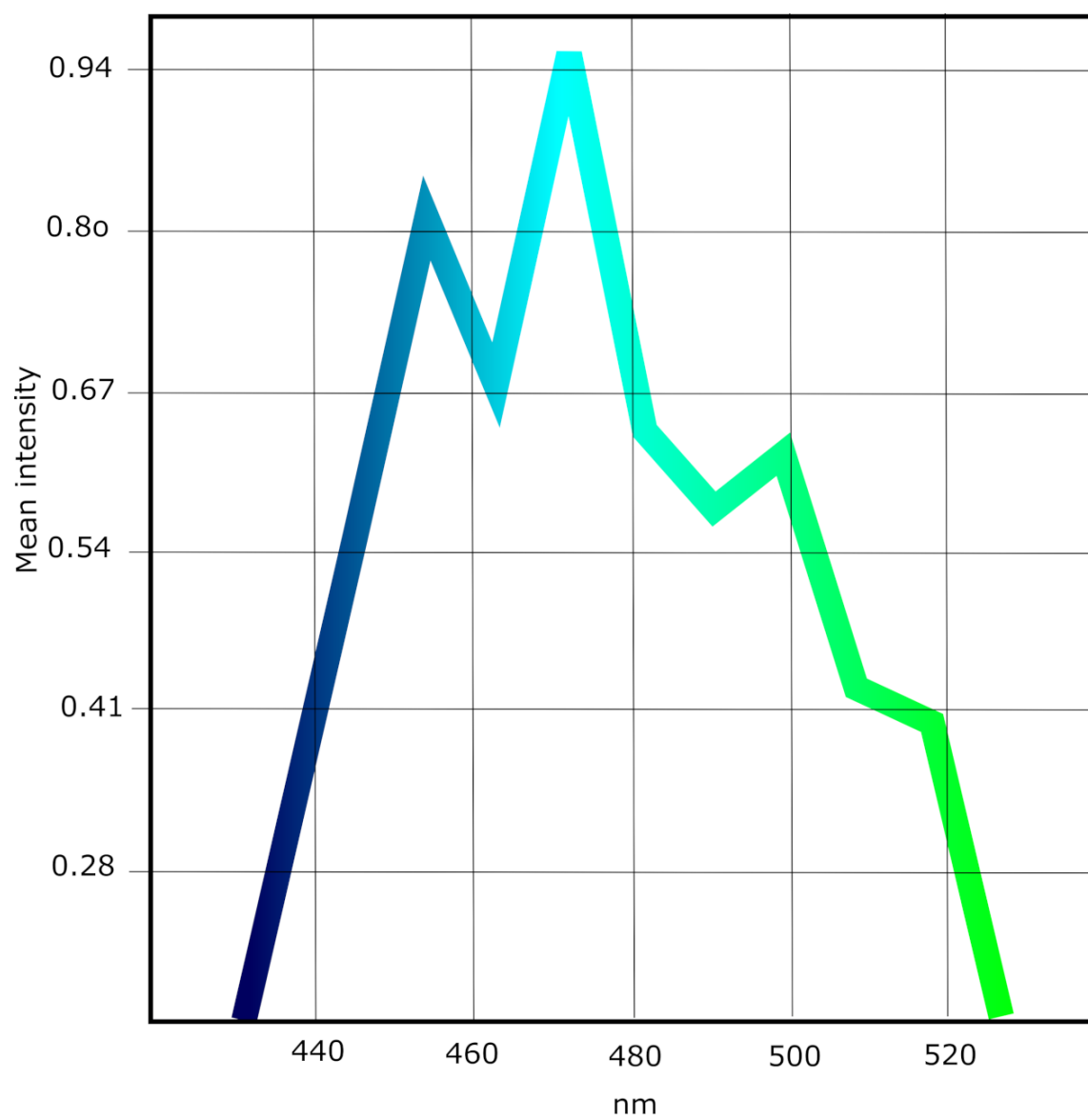
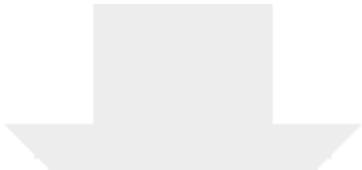
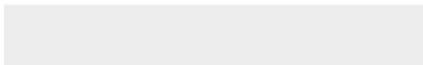
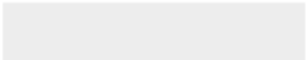


Fig. 3





[Click here to access/download](#)
Supplementary Material
ESM.docx



Anexo 2

Manuscrito publicado en: Miramontes-Sequeiros, L. C., Palanca-Castán, N., Caamaño-Chinchilla, L. y Palanca-Soler, A. (2018a). The phenotypic variability in *Rana temporaria* decreases in response to drying habitats. *Science of the Total Environment*, 612, 538-543. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.261>

Para su redacción se utilizó y reestructuró parte del material incluido en el capítulo III.



The phenotypic variability in *Rana temporaria* decreases in response to drying habitats



Luz Calia Miramontes-Sequeiros^{a,*}, Nicolás Palanca-Castán^b,
Laura Caamaño-Chinchilla^a, Antonio Palanca-Soler^a

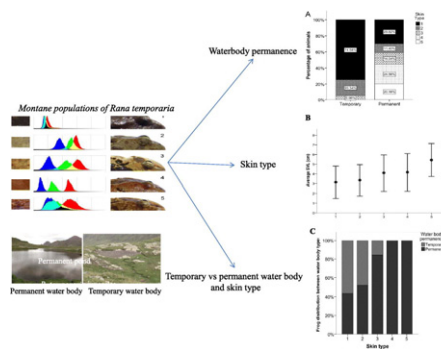
^a Laboratorio de Anatomía Animal, Departamento de Ecología y Biología Animal, Universidade de Vigo, Spain

^b Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV), Neuroscience of Circuits and Systems laboratory, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Chile

HIGHLIGHTS

- Drought is hypothesized to impact the phenotypic variability of *Rana temporaria*.
- A new non-invasive method was implemented to test such effect.
- Phenotypic variability decline was found in frogs developing in drying habitats.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2017

Received in revised form 20 August 2017

Accepted 26 August 2017

Available online xxxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Anuran

Rana temporaria

Phenotypic plasticity

Animal coloration

Amphibian conservation

ABSTRACT

In this study, we evaluated the diversity of skin coloration as a proxy for phenotypic diversity. The European common frog (*Rana temporaria*) populations from the Southern slope of central Pyrenees lie at the limit of the species distribution in latitude and altitude. We analysed the relationship of skin color typology with different environmental variables and found a large decrease in skin type variety in frogs developing in temporary water bodies when compared to those developing in permanent water bodies. Our results show that our method can be used as a non-invasive way to study phenotypic diversity and suggest that adaptation to an early metamorphosis in a rapidly-drying habitat can have negative effects on adult phenotypic diversity. In light of these results, we argue that access to permanent water bodies is important to prevent loss of diversity in anuran populations and reduce their vulnerability to environmental impacts as well as pathogens.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Amphibians have become a cause of great concern in the recent years due to their sharply declining populations worldwide and their high extinction rate. Some estimates suggest that current amphibian extinction rates are much higher than background rates (McCallum, 2007) and that loss of currently threatened species will lead to mass-

* Corresponding author at: Laboratorio de Anatomía Animal, Facultad de Biología, Universidade de Vigo, Campus Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo, Spain.
E-mail address: kalya@uvigo.es (L.C. Miramontes-Sequeiros).

extinction levels of biodiversity loss (Barnosky et al., 2011). This fast decline of amphibian populations is a consequence of the special vulnerability of many amphibian species to environmental changes and anthropogenic impacts (Wake and Vredenburg, 2008). Montane populations are especially sensitive to environmental disturbances. Their habitat is naturally fragmented, and alpine populations are usually adapted to a narrow microclimatic niche, which combined with the natural zonation that occurs with altitude means that plant and animal assemblages in high-altitude areas are more fragile than their lowland equivalents. Alpine populations of anurans have been shown to be especially sensitive to the introduction of invasive species and epidemics caused by environmental disturbances (Knapp and Matthews, 2000; Bosch et al., 2007). The monitorization of vulnerable populations is an important endeavour if we want to understand the factors that drive amphibian decline. The European common frog, *Rana temporaria*, is the most widespread anuran species of Europe (Gasc et al., 1997). The research presented here deals with populations of *R. temporaria* from the Southern Slope of central Pyrenees, which lie at the limit of the species distribution in latitude and altitude. Studies of wild populations require the development of effective monitorization tools that can be applied without harming them. We specifically aimed to develop and test a method to study the skin color in *R. temporaria* as a proxy for phenotypic diversity.

Color and dorsal pattern polymorphism are widespread among anurans, and have been suggested before as a way to study phenotypic variation in these animals (Hoffman and Blouin, 2000). These colors and patterns are determined by integumentary pigment-bearing structures known as chromatophores (Duellman and Trueb, 1994). In amphibians there are three main types of chromatophores: the outermost xanthophores located below the basal lamella, iridophores located beneath the xanthophores and melanophores located directly under the iridophores and extending processes upward around them (Bagnara, 1976). When light strikes the surface of a frog, short wavelengths (blue-violet) are absorbed by the xanthophore layer, which serves as a filter, and scattered by the reflective platelets found inside the iridophores. Long wavelengths (red-orange) are absorbed in the melanin layer. As a result, intermediate wavelengths pass mostly unobstructed and the animals tend to appear yellow-green (Bagnara and Hadley, 1973). Factors such as skin morphology and the quantity and distribution of the different chromatophore types determine the final color of the animal. These factors can vary depending on genetics, physiology and environment, and reflect the phenotypic variability of populations. In the present paper, we use a new analysis method to evaluate and classify the coloration of frogs sampled from our study population. The presence and relative quantity of the different skin types was used as the independent variable in an exploratory study that tested whether there was any relationship between one or more environmental factors and phenotypic variability as measured with our methods.

2. Materials and methods

2.1. Animals and sampling

During the end of July and the beginning of August 2014, after the breeding season that takes place between March and April in area 1 (mean altitude 1600 msl) and May through the beginning of June in area 2 (mean altitude 2400 msl), we took data from 373 individuals of *R. temporaria*, all of whom were older than one year, and from which only 37 were breeding adults. Neither the morphological (no visible secondary sexual characters) nor the genetic (sex reversal dependent on temperature (Wallace et al., 1999)) sex of the other sub-adult frogs could be determined. We sampled 30 locations distributed within two geomorphological areas in the southern slope of the central Pyrenees (Fig. 1). Among the 30 locations we found two different types of waterbodies, permanent and temporary. The permanent waterbodies, which are composed from lakes with a glacier origin, usually have

water supply all year round and are larger in size, whereas ponds with a water fountain origin tend to be smaller. These temporary water bodies are ponds that originate not only from melted snow patches forming water bodies that usually last in the area 1 until the end of May, and in area 2 until the beginning of August; but also from close neighbouring meanders when water levels decrease in both study areas at the beginning of August. The size range for the permanent waterbodies is 6000 to 300 m², and for the temporary waterbodies 5 to 300 m². When the temporary waterbodies disappear the frogs do not migrate due to physical barriers, instead they search humidity in abandoned galleries and under the stones, awaiting the end of August rainfalls. This provides a temporary sanctuary away from small mammals and other predators and allows the frogs to prepare for the hibernation period that starts at the beginning of September when the first snowfall arrives.

These frogs represent the total frog number found during our trekking surveys. Both in land and shoreline individuals were captured with a fine net and processed in batches of 10–20 individuals. Because humidity levels are known to influence coloration in *R. temporaria* (Rowlands, 1952); they were kept constantly wet for 30–60 min in a fine cloth bag before being photographed on top of a white portable grid (for scale adjustment) with a Canon PowerShot SX260 HS digital camera. All pictures were taken between 12:00 and 14:00 in full sunlight on days with no overcast cloud cover and the camera was set to auto-expose all images in order to minimize any effects of differing ambient illumination and to generate consistently exposed photographs. Because *R. temporaria* shows dynamic dichromatism during the breeding season (Bell and Zamudio, 2012), our pictures were taken at the end of July and the beginning of August, well outside the breeding season of this population, which takes place at the beginning of June after the snow cover melts. The resulting digital images were processed and analysed using the GIMP 2.8 Open Source Image Editor. After photographs were taken, frogs were immediately released without further manipulation.

2.2. Color analysis

A photographic area (200 × 200 pixels) was cropped starting from the level of the frog's eyes going to the hind limbs using a cropping tool, such that only the dorsal body surface of the frog was analysed (Fig. 2, first column). This area was carefully selected to exclude dark dorsal spots, as we were more interested in the base skin color than in the dorsal melanin spot patterns. Several color models can be used to represent the color of digital photographs (Montgomerie, 2006). We chose the RGB color model for our color sampling. Although RGB color is designed for the human visual system and may not explain the color of amphibians (or predators) (see Endler, 1990) it allowed us to measure differences in color, which is all that is required for the purposes of comparing different subsets of animals. We used the GIMP 2.8 histogram tool to create a color histogram of the selected area of skin surface that could help us with defining the coloration of each of the studied frogs in a three-dimensional RGB space (Fig. 2, second column).

2.3. Statistical analysis

Histograms showing the RGB data were processed using MorphoJ (Oracle Corporation) using the maximum point in the y-axis and left-most point on the x-axis of each color's curve as landmarks. These landmarks were used to perform a Procrustes analysis to determine the principal components and their dimension of variation. This process allowed us to determinate the main variables that can be used to group our histograms into significantly different clusters. We found that the main component of the Procrustes analysis of variance was very highly correlated to the displacement of the red and blue curves in relation to the green.

We used the distance between the medians of the green and red peaks and the distance between the medians of the green and blue

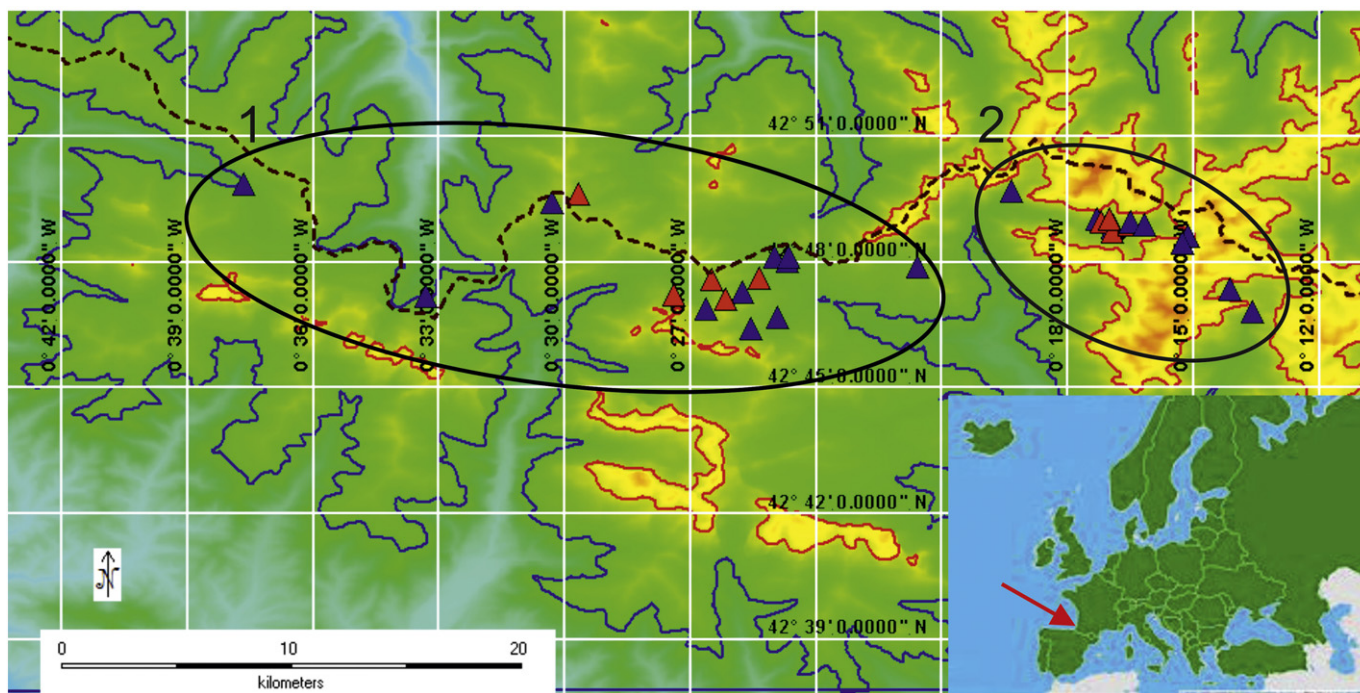


Fig. 1. Map of the study area showing the different sampling sites located in the Southern slope of central Pyrenees. The small map on the bottom right corner shows the approximate location of the study area. Triangles in the main picture mark each of the sampling locations. Red triangles belong to temporary water bodies and blue triangles belong to permanent water bodies. The medial dashed line marks the border between Spain and France. Black ellipses mark the two main study areas: Aguastuertas-Portalet (area 1) and Formigal-Bachimaña (area 2). Altitude lines in blue and red correspond to 1600 msl and 2400 msl respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

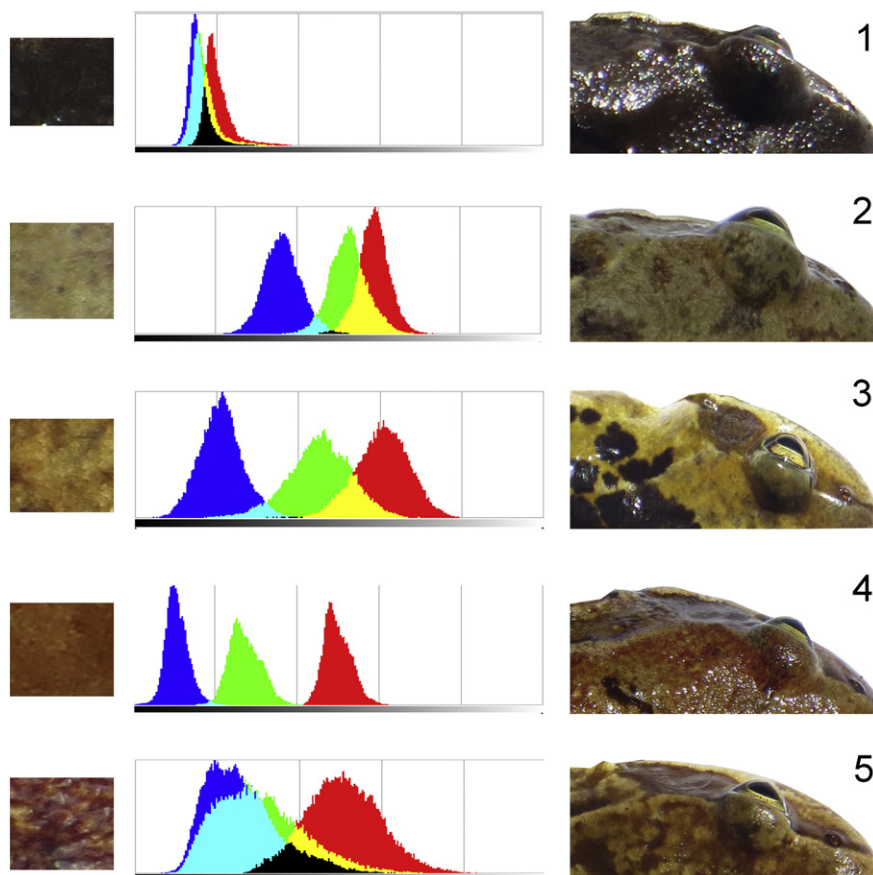


Fig. 2. Examples of skin types as defined in our analysis of dorsal coloration. The first column shows the picture used for color analysis, the second column its corresponding RGB histogram and the third column a partial picture of the animal from which we took the data. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

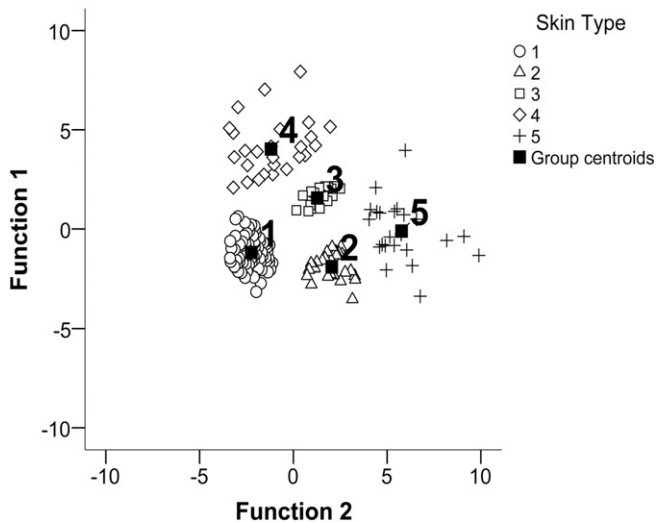


Fig. 3. Principal component analysis of the final selected cases showing the clustering around five distinct skin types groups. Function 1 represents in a 0.985 the distance between blue and green and Function 2 represents in a 0.947 the distance between green and red. Distances refer to the distances of the RGB histograms (Fig. 2, second column).

peaks in the intensity axis as variables for hierarchical conglomerate analysis that grouped them into five distinct clusters (Fig. 2). We used those five clusters as seed for a discriminant analysis using a matrix of within-group covariance. This analysis was able to separate our cases into the five clusters with a high degree of certainty (Wilks' Lambda = 0.022 $p < 0.000$). Cases that had less than a 90% of certainty of belonging to any cluster were discarded to avoid confounding factors in the subsequent analyses, like small, environmentally related color changes, thus reducing the total cases to 173. Functions 1 and 2 of the discriminant analysis were highly correlated with the blue-green (0.985) and green-red (0.947) variables (Fig. 3). We used these groups to evaluate the differences in coloration distribution between different *R. temporaria* subpopulations based on several variables. The variables we tested were: geology of the area dividing our specific locations into two main sectors that represented different geomorphological areas: one area predominantly calcareous and sandstones; and a second one predominantly granitic, altitude (area 1 with a mean altitude of 1700 m, and area 2 with a mean altitude of 2500 m), frog size (snout-vent length) and whether the lake or pond where the frog was captured was temporary or permanent. Although in the map we see the ponds and lakes close due to the severe fragmentation of the high mountain habitats in our study area of the Southern slope of the Pyrenees, and to the frequency of physical barriers (cliffs, rocky places, and snow patches), the frogs have limits in their dispersion. In addition we did not find any specimens far from a water body (mostly we find them in a terrestrial range no longer than 10 m far from a water body which is supported by the work of Vences et al., 1999); therefore we assume that the specimens collected in the boundaries of the waterbodies were mostly born in there.

3. Results

During our analysis we found significant differences in geology (Pearson's chi-squared, $p < 0.001$, Cramer's V = 0.880), altitude (one-way ANOVA, $p < 0.001$, $F = 74.734$), temporality of water bodies (Pearson's chi-squared, $p < 0.001$, Cramer's V = 0.292) and distribution of skin types (Pearson's chi-squared, $p < 0.001$, Cramer's V = 0.328) between our two main areas. In order to avoid areas acting as a confounding factor in our analyses we analysed the dependency between our variables for each area separately. Area 1 (Aguastuertas-Portalet) and 2's (Formigal-Bachimaña) geographical location can be seen in Fig. 1. It is important to note that snout-vent length (SVL) showed no

significant differences between areas (one-way ANOVA, $p = 0.748$, $F = 0.103$). Skin color distribution in our studied individuals was consistently dependent on the temporality of the water bodies in the sampling area (area 1: Pearson's chi-squared, $p < 0.001$, Cramer's V = 0.494; area 2: Pearson's chi-squared, $p < 0.001$, Cramer's V = 0.549). For some

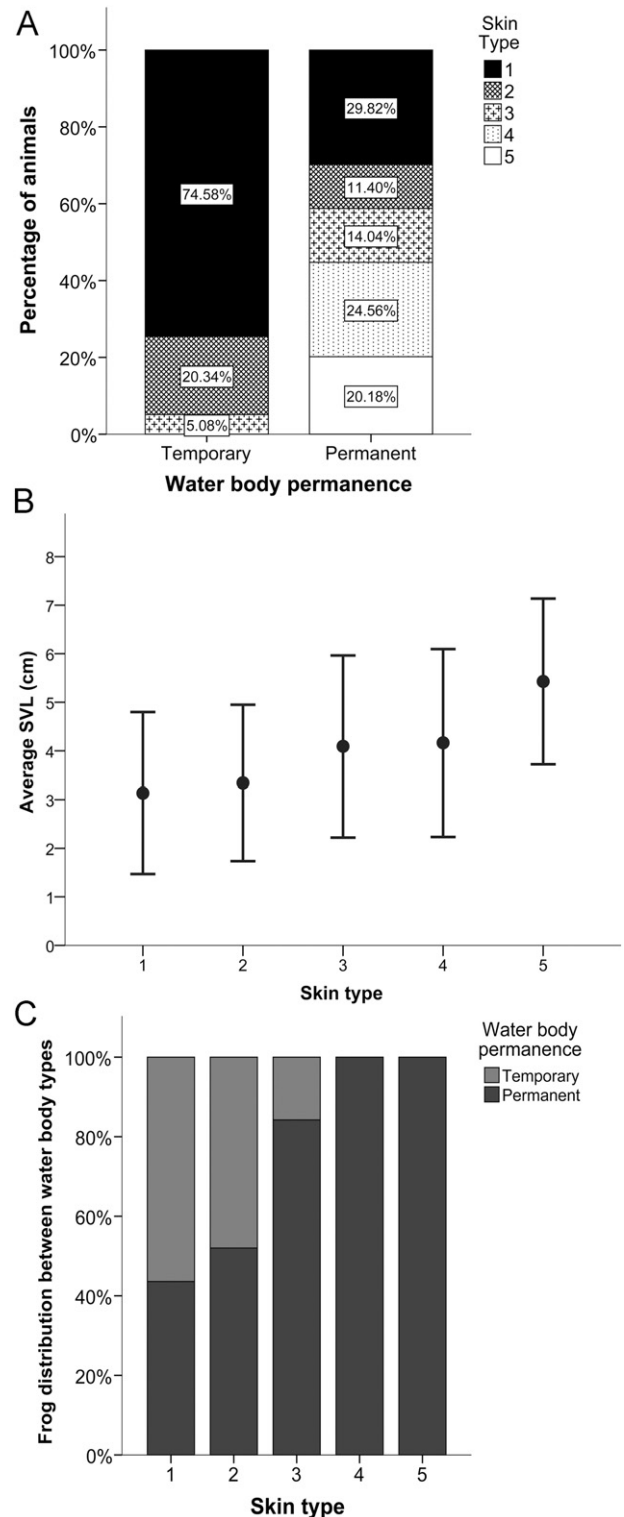


Fig. 4. Relationships between body size, color and water body permanence. Panel (a) shows the percentage of animals with each skin type for temporary and permanent water bodies. Panel (b) shows the average SVL in cm for different skin types. Error bars represent standard deviation. Panel (c) shows, for each skin type, the percentage of frogs with that skin type in temporary versus permanent water bodies.

other variables it showed dependency within one of the areas but not the other as was the case with SVL (area 1: one-way ANOVA, $p = 0.053$, $F = 2.453$; area 2: one-way ANOVA, $p < 0.001$, $F = 7.250$) and altitude (area 1: one-way ANOVA, $p < 0.001$, $F = 6.120$; area 2: one-way ANOVA, $p = 0.061$, $F = 2.344$). In area two, the only area to present variation on geological substrate across sites, there was no relationship between geology and skin color distribution (Pearson's chi-squared, $p < 0.188$, Cramer's $V = 0.260$).

On the other hand, our sampled frogs were mainly sub-adults but we could analyse the SVL between sexes in 37 adult individuals within both main areas (representing 9.91% of the total frog number studied). We did not find any SVL significant differences between males and females (male SVL mean 6.16 cm, Standard deviation 0.63 cm; female SVL mean 5.67 cm, Standard deviation 1.24 cm). Frog body size (measured as SVL) showed a consistent dependency across sectors for altitude (area 1: one-way ANOVA, $p = 0.001$, $F = 3.007$; area 2: one-way ANOVA, $p < 0.001$, $F = 10.778$) and water body temporality (area 1: one-way ANOVA, $p = 0.041$, $F = 4.331$; area 2: one-way ANOVA, $p < 0.001$, $F = 44.494$). There was no dependency of frog body size with geological substrate in area 2 (one-way ANOVA, $p = 0.097$, $F = 2.815$).

Lastly, there was a significant and consistent dependency between altitude and temporality of the water bodies (area 1: one-way ANOVA, $p < 0.001$, $F = 38.098$; area 2: one-way ANOVA, $p < 0.001$, $F = 19.820$).

Of all the tested factors, the one that had the largest and most consistent effect on the variety and distribution of skin types was the temporality of the water bodies (Fig. 4a). Frogs found nearby or inside the permanent water bodies had all five skin types, with a majority of type 1 (29.82%) and a small proportion of 2 and 3 (11.40% and 14.04% respectively) with 4 and five in between (24.56% and 20.18% respectively). On the other hand, frogs found nearby or inside the temporary water bodies had only types 1, 2 and 3, with types 4 and 5 missing entirely (Fig. 4a). A large majority of frogs (75%) had type 1 skins, followed by type 2 (20.34%) and a very small proportion of type 3 (5.08%).

4. Discussion

Our results show that skin color within the studied *R. temporaria* populations can be measured, that it is diverse enough to be divided into specific types, and that the presence and abundance of those types show variations across different areas and environments. This opens the possibility of using these color variations as a way to evaluate phenotypic diversity with non-invasive methods. Most notably, we found that skin type distribution and body size were both highly dependent on whether the water bodies where the individuals were captured were temporary or permanent.

Amphibian larvae are known to have a high phenotypic plasticity in response to habitat desiccation, undergoing metamorphosis at an earlier time and at a smaller size when they develop in temporary water bodies than in more permanent ones (Newman, 1989). This plasticity is under a heavy selective pressure, since failing to undergo metamorphosis before the habitat desiccation results in death, while undergoing

metamorphosis at a larger body size results in higher fitness. Indeed, this environmental factor has been suggested to shape the genetic make-up of populations that need to face this trade-off (Palo et al., 2003; Lind et al., 2011; Lind and Johansson, 2011), and populations that become specialized in rapid development and an early metamorphosis at low metamorphic size show a lower degree of phenotypic plasticity (Lind and Johansson, 2007). We can confirm that this is also the case in our populations, since we found a significant size difference between frogs from temporary and permanent water bodies (Fig. 4a and b) consistent with a smaller size at metamorphosis. In our sampled locations there are physical barriers between permanent and temporary lakes and ponds that do not allow the frogs to reach a different water body (Fig. 5).

Water body temporality also had a significant effect on skin color distribution. Although there was some relationship between body size and skin color distribution, it was only in one of our study areas, whereas the relationship between skin color distribution and water body temporality was more consistent across both areas. This makes it very likely that the relationship between SVL and skin color distribution in area 2 is a consequence of the effect of water body temporality on both variables rather than a direct consequence of larger frogs having morphological differences (e.g. thicker skin). Another possibility is the existence of a previously undescribed non-systematic ontogenetic color variation in *R. temporaria* tied to older populations in permanent lakes but the early differentiation of color morphotypes and the presence of all color types across all frog sizes make this possibility unlikely.

We suggest that the observed differences in skin type presence and variety between temporary and permanent lakes are a consequence of a relationship between phenotypes in which skin types 4 and 5 (and 3 to a lesser extent) are much less common or completely absent among frogs that show an early metamorphosis at a small size (Fig. 4c). To the best of our knowledge, this is the first report in anurans of such a drastic decrease in adult phenotypic variability in response to environmental pressures on the larval stage. We believe this is especially significant because the studied trait does not have a direct relation to life history as other traits such as juvenile size. If adaptation to reproduction in more temporary water bodies can reduce phenotypic diversity in multiple traits, it could have significant consequences for conservation and population viability. In addition, given that skin color is determined in large measure by the structure of the skin as well as the quantity and distribution of the different chromatophores; it is very likely that there is a link between genotypic diversity and skin color diversity. This is also suggested by the geographical differences in skin type distribution found in this study. However, it is impossible to unequivocally determine the presence and extent of this link, something that will be the subject of further studies. Determining this link is relevant because phenotypic and genotypic diversity are important for the persistence of declining populations and resistance against invasive species and pathogens (Forsman, 2014), both of which represent significant threats to anuran populations (Knapp and Matthews, 2000; Bosch et al., 2007). Thus, factors that affect the availability of safe permanent water bodies



Fig. 5. Comparison of permanent (right hand side) and temporary (left hand side) water bodies from our study area in the Southern slope of the Pyrenees.

such as the introduction of non-native fish for recreational purposes or rising temperatures as a consequence of climate change will have a direct impact on the capacity of *R. temporaria* and other anurans to cope with further environmental change and will reduce the viability of vulnerable populations.

5. Conclusions

In conclusion, our study shows that the distribution of different skin colors in populations of *R. temporaria* is a non-random factor that can vary with geography and environmental conditions. The differences found between permanent and temporary water bodies suggest that skin color distribution is a suitable proxy to study phenotypical variability, and the variation encountered between separate geographical areas suggests a link to genetic variability that requires further study. The method presented in this paper allows for an objective measurement of frog skin color and the subsequent analysis of skin color distribution within and between populations. This method is easy to perform in the field along with other types of data sampling and can provide information about phenotypic diversity, which makes it a valuable tool for conservation-related monitorization of *R. temporaria* and other anurans.

Acknowledgements

This project was supported by the Animal Anatomy Laboratory Foundation (2014-001). We thank Ursicino Abajo, warden of the Respomuso mountain refuge, for his logistic and gastronomic support, and Krista L. Miramontes for her help reviewing the manuscript.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Bagnara, J.T., 1976. Color change. In: Lofts, B. (Ed.), *Physiology of the Amphibia*. vol. 3. Academic Press, New York, pp. 1–52.
- Bagnara, J.T., Hadley, M.E., 1973. *Chromatophores and Color Change: The Comparative Physiology of Animal Pigmentation*. Prentice-Hall, New Jersey.
- Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., et al., 2011. Has the earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471:51–57 (Mar 3). <http://dx.doi.org/10.1038/nature09678>.
- Bell, R.C., Zamudio, K.R., 2012. Sexual dichromatism in frogs: natural selection, sexual selection and unexpected diversity. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 279:4687–4693. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.1609>.
- Bosch, J., Carrascal, L.M., Duran, L., et al., 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 274:253–260. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2006.3713>.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 1–696.
- Endler, J.A., 1990. On the measurement and classification of color in studies of animal color patterns. *Biol. J. Linn. Soc.* 41:315–352. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.1990.tb00839.x>.
- Forsman, A., 2014. Effects of genotypic and phenotypic variation on establishment are important for conservation, invasion, and infection biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:302–307. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1317745111>.
- Gasc, J.P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, D., et al., 1997. *Atlas of amphibians and reptiles in Europe. Collection Patrimoines Naturels*, 29, Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle et Service du Patrimoine Naturel, Paris, pp. 1–496.
- Hoffman, E.A., Blouin, M.S., 2000. A review of color and pattern polymorphisms in anurans. *Biol. J. Linn. Soc.* 70:633–665. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.2000.tb00221.x>.
- Knapp, R.A., Matthews, K.R., 2000. Non-native fish introductions and the decline of the mountain yellow-legged frog from within protected areas. *Conserv. Biol.* 14:428–438. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99099.x>.
- Lind, M.I., Johansson, F., 2007. The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *J. Evol. Biol.* 20:1288–1297. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01353.x>.
- Lind, M.I., Johansson, F., 2011. Testing the role of phenotypic plasticity for local adaptation: growth and development in time-constrained *Rana temporaria* populations. *J. Evol. Biol.* 24:2696–2704. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02393.x>.
- Lind, M.I., Ingvarsson, P.K., Johansson, H., et al., 2011. Gene flow and selection on phenotypic plasticity in an island system of *Rana temporaria*. *Evolution* 65:684–697. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01122.x>.
- McCallum, M.L., 2007. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *J. Herpetol.* 41:483–491. [http://dx.doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[483:ADOECD\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[483:ADOECD]2.0.CO;2).
- Montgomery, R., 2006. Analyzing colors. In: Hill, G.E., Mc-Graw, K.J. (Eds.), *Bird Coloration, Vol. 1: Mechanisms and Measurements*. Harvard University Press, Cambridge, pp. 90–147.
- Newman, R.A., 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology* 70:1775–1787. <http://dx.doi.org/10.2307/1938111>.
- Palo, J.U., O'Hara, R.B., Laugen, A.T., et al., 2003. Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Mol. Ecol.* 12:1963–1978. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01865.x>.
- Rowlands, A., 1952. The influence of water and light upon the color change of sightless frogs (*Rana temporaria*). *J. Exp. Biol.* 29, 127–136.
- Vences, M., Piqué, N., Lopez, A., et al., 1999. Summer habitat population estimate and body size variation in a high-altitude population of *Rana temporaria*. *Amphibia-Reptilia* 20, 431–435.
- Wake, D.B., Vredenburg, V.T., 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:11466–11473. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0801921105>.
- Wallace, H., Badawy, G.M.I., Wallace, B.M.N., 1999. Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell. Mol. Life. Sci.* 55:901–909. <http://dx.doi.org/10.1007/s000180050343>.

Anexo 3

Manuscrito enviado para su publicación en la revista Ichthyology and Herpetology.
Para su redacción se utilizó y reestructuró parte del material incluido en el capítulo IV.

Ichthyology and Herpetology

DARK SPOTS PATTERNS IN HIGH MOUNTAIN RANA TEMPORARIA (AMPHIBIA, ANURA) ARE VALUABLE FOR CAMOUFLAGE

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Articles
Section/Category:	Ecology & Ethology
Corresponding Author:	Laura Caamaño-Chinchilla University of Vigo - Lagoas Marcosende Campus: Universidade de Vigo Vigo, SPAIN
First Author:	Laura Caamaño-Chinchilla
Order of Authors:	Laura Caamaño-Chinchilla
	Pilar Caamaño-Chinchilla
	Antonio Palanca-Soler
Abstract:	The objective of this study is to describe the variability in the dark spots pattern on the dorsal skin of <i>Rana temporaria</i>. This research clears up whether the variation in these patterns depends on variables such as environmental properties or the size of the frog, or whether it is due exclusively to a camouflage mechanism. We have digitally imaged 372 individuals of <i>R. temporaria</i> belonging to different high mountain populations in the Central Pyrenees (Iberian slope) at altitudes between 1500 and 2450 m a. s. l. (meters above sea level). We have recorded environmental properties such as the altitude and the temporality of the water bodies, and linked them with characteristic frog variables such as size and distribution of the dark spots pattern. We have established the relationship between the degree of dark pigmentation of the dorsal spots pattern in <i>R. temporaria</i> and the temporality of the water bodies and the size of the individuals. Individuals vary their dark spots pattern as an adaptive mechanism to the environment. We conclude that the dark spots pattern on the dorsal skin of <i>R. temporaria</i> is due to camouflage.

COVER LETTER

Dear editors,

We submit an original research paper entitled: "Dark spots patterns in High mountain *Rana temporaria* (*Amphibia*, *Anura*) are valuable for camouflage".

Our study is concerned to pigmentation patterns distribution in common frog when it adapts to high mountain environments at the limit of the species distribution in latitude and altitude. These results have not been published anywhere else.

We have photographed "in situ" different frog populations inhabiting high altitudes between 1500 to 2450 m a. s. l. (meters above sea level). We have used these images as a resource to establish a connection between the variability of dark spots patterns of the frog dorsal skin, the size of the individuals and environmental variables, such as the altitude and the temporality of the water bodies.

We think this paper is appropriate to be published in this journal because it is specialized in amphibian ecology. We believe that studies focusing on the dark spots skin pattern as a camouflage mechanism are original in *Rana temporaria* species.

We declare that all authors agree to the publication of this manuscript.

Regarding the information of the figures to be published, we prefer the figures to be in two-column size and in grey scale.

We hope that you will consider the paper for publication in such a reputed journal and look forward to your response.

Yours sincerely

Laura Caamaño-Chinchilla, Pilar Caamaño-Chinchilla and Antonio Palanca-Soler

**DARK SPOTS PATTERNS IN HIGH MOUNTAIN *RANA TEMPORARIA*
(*AMPHIBIA*, *ANURA*) ARE VALUABLE FOR CAMOUFLAGE**

Laura Caamaño-Chinchilla¹, Pilar Caamaño-Chinchilla², Antonio Palanca-Soler².

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Fisiología, Biología Molecular, Mejora, Protección y Producción Vegetal, Universidad de Vigo, Campus As Lagoas Marcosende, 36310, Vigo, Spain; Email: (LCC) lauracaach@gmail.com. Send reprint requests to this address.

² Fundación Laboratorio de Anatomía Animal, c/ Julia Minguillón 2, 2º C, 36201, Vigo, Spain; Email: (PCC) caamano.pilar.411@gmail.com; (APS) apalancasoler@telefonica.net.

Abstract

The objective of this study is to describe the variability in the dark spots pattern on the dorsal skin of *Rana temporaria*. This research clears up whether the variation in these patterns depends on variables such as environmental properties or the size of the frog, or whether it is due exclusively to a camouflage mechanism. We have digitally imaged 372 individuals of *R. temporaria* belonging to different high mountain populations in the Central Pyrenees (Iberian slope) at altitudes between 1500 and 2450 m a. s. l. (meters above sea level). We have recorded environmental properties such as the altitude and the temporality of the water bodies, and linked them with characteristic frog variables such as size and distribution of the dark spots pattern. We have established the relationship between the degree of dark pigmentation of the dorsal spots pattern in *R. temporaria* and the temporality of the water bodies and the size of the individuals. Individuals vary their dark spots pattern as an adaptive mechanism to the environment. We conclude that the dark spots pattern on the dorsal skin of *R. temporaria* is due to camouflage.

Resumen

El objetivo de este estudio es describir la variabilidad del patrón de manchas oscuras en la piel dorsal de *Rana temporaria*. Esta investigación clarifica si la variación de estos patrones depende de variables como las propiedades ambientales o el tamaño de la rana, o si se debe exclusivamente a un mecanismo de camuflaje. Hemos tomado imágenes digitales de 372 individuos de *R. temporaria* pertenecientes a diferentes poblaciones de alta montaña en el Pirineo Central (vertiente ibérica) a altitudes entre 1500 y 2450 m s. n. m. (metros sobre el nivel del mar). Hemos registrado propiedades ambientales como la altitud y la temporalidad de las masas de agua, y las hemos relacionado con variables características de las ranas como el tamaño y la distribución del patrón de manchas

oscuras. Hemos establecido la relación entre el grado de pigmentación oscura del patrón de manchas dorsales en *R. temporaria* y la temporalidad de las masas de agua y el tamaño de los individuos. Los individuos varían su patrón de manchas oscuras como un mecanismo de adaptación al entorno. Concluimos que el patrón de manchas oscuras en la piel dorsal de *R. temporaria* se debe al camuflaje.

Colour and dorsal pattern polymorphisms are widespread among anuran amphibians and reflect the phenotypic variability in these animals (Hoffman and Blouin, 2000; Miramontes-Sequeiros et al., 2018a). Melanophores are melanin-bearing pigment cells, which provide two types of colour mechanisms depending on their location in the skin. When melanophores are located in the epidermis, they deposit a variable amount of melanin in adjacent epidermal cells, leading to the formation of dark spots patterns (Bagnara and Matsumoto, 2006). When they are located in the dermis, they contribute to skin colour together with other chromatophores, as described in our article about the phenotypic variability of *Rana temporaria* (Miramontes-Sequeiros et al., 2018a). The European common frog, *R. temporaria*, is the most widespread amphibian species in Europe (Gasc et al. 1997). The Southern limit of its distribution in latitude and altitude is located on the Southern slope of Central Pyrenees, which is the habitat of the target specimens in this study.

In the present paper, we investigate the potential relationship between several variables (environmental and species-specific) with variations in the distribution of dark spots pattern on the dorsal skin of *R. temporaria* inhabiting the high Pyrenean Mountains. These amphibians change their spotting pattern by modifying the number of chromatophores and the amount of pigment in response to a persistent stimulus, such as exposure to a light or dark background over prolonged periods (e.g. several weeks or a

season). These changes are morphological, slow and can be reversed (Dawes, 1941a, 1941b; Parker, 1948; Hadley and Quevedo, 1966; Bagnara et al., 1968; Fernandez and Bagnara, 1991; Bagnara and Matsumoto, 2006).

Environmental temperature is another factor that stimulates changes in the degree of dark pigmentation. Regardless of background lighting, the dark spots pattern on the dorsal skin increases with low winter temperatures (5° C) in *R. chiricahuensis* and in *Xenopus laevis* (Fernandez and Bagnara, 1991; Roubos et al. 2010). However, our target species, *R. temporaria*, remains hibernating under the snow during the lowest temperature period (from October to May). In addition, individuals with melanistic patterns reach higher temperatures when experimentally exposed to the sun. This is advantageous under low temperature conditions but it depends on the individual's behaviour and exposure to radiation (Vences et al., 2002; Clusella-Trullas et al., 2007).

The degree of dark pigmentation shows correlation with latitude clines. When latitude increases by 1500 km or more, *R. temporaria* populations change the dark spots pattern as a result of environmentally induced phenotypic plasticity (Alho et al., 2010).

Melanistic pattern variation also reflect the age difference between the populations (Riobo et al., 1999; Alho et al., 2010), which has also been observed in *R. septentrionalis* (Kramek and Stewart, 1980).

Dark spots patterns are adaptive and work as a camouflage mechanism in *R. septentrionalis* (Kramek and Stewart, 1980) and in toad *Anaxyrus fowleri* (Rabbani et al., 2015).

The objective of this study is to describe the variability of the dark spots pattern on the dorsal skin of *R. temporaria* and to find out whether it is related to any environmental variable, size or whether it is exclusively a camouflage mechanism.

MATERIAL AND METHODS

Material.—

We have examined the dorsal dark spots pattern of *R. temporaria* from 30 different locations distributed in the Southern limit of the Central Pyrenees (Iberian slope) from 1500 to 2450 m a. s. l. (meters above sea level). The sampled sites were located at N latitudes between 42° 46 ' and 42° 50' (the maximum between sites was 7 km) and longitudes W between 0° 13' and 0° 37' (the maximum distance was 45 km approximately). We have digitally imaged 372 *R. temporaria* specimens. Sampling was conducted in two types of water bodies: temporary and permanent. Temporary ponds arise from water sources originated by snowmelt during the summer. They form small water bodies that frogs use as breeding areas (Miramontes-Sequeiros et al., 2018b). Permanent water bodies are large lakes originated by glacial melt. They receive snow water inflows and remain with water throughout the year (Miramontes-Sequeiros et al., 2018a). During the sampling, we have recorded as well different environmental variables such as altitude and water body temporality. Sampling was carried out for 15 days, from July 20 to August 5, 2014. In this way, we have prevented the detection of possible seasonal morphological changes. Likewise, we have avoided colour patterns specific for reproduction periods. Adult individuals modify their colours during the breeding season (Bell and Zamudio, 2012) and, according to the altitude of our study area, this season corresponds to May and June (author's observation). Most of small individuals sampled for this study were located in close proximity to ponds and wetlands; while larger individuals were captured further away from water bodies.

Digital Imaging.—

Individuals were captured with a fine net and processed in batches of 10-20 units. Because humidity levels are known to influence the coloration of *R. temporaria*;

(Rowlands, 1952); they remained constantly moist for 30-60 minutes in a fine cloth bag. Then we photographed them on a portable white grid (for scale adjustment) with a Canon PowerShot SX260 HS digital camera. We took all photographs between 12:00 and 14:00 in full sunlight, on days without cloud cover. The camera was set to auto-exposure mode on all images to minimize the effect of possible differences in ambient illumination. In each specimen, we measured the snout to vent length (SVL). Once photographed, the frogs were immediately released without further manipulation.

***Image processing.*—**

We have analyzed and processed the resulting digital images in RGB using the GIMP 2.10.20 Open Source Image Editor software (GIMP Team, 2020). To define the analysis surface, we have carefully cropped the part of the image corresponding to the dorsal surface of the frog, excluding its limbs, and noted the number of pixels in the selected area (N_T). Subsequently, we have selected the black colour defined by a single threshold for all the images and noted the number of pixels (N_B). Then, we have calculated the percentage of dark spots (C) of the selected skin area using the following equation [$C(\%) = 100(N_B / N_T)$].

***Statistical analysis.*—**

We have carried out the statistical analysis using the IBM SPSS, version 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) statistical package for Windows. During the sampling, we have registered different environmental variables such as altitude and temporality of the water bodies and we have analyzed the existing relationship between them and the frog-specific variables such as frog size (SVL) and percentage of dark spots (C). We have divided each of these variables into optimized intervals. Optimization was performed using point scatter plots. We have analyzed the relationship between the different variables using contingency tables and Pearson's Rho correlation (ρ), and determined

the level of significance by applying Pearson's Chi-square (χ^2). The most discriminating combinations are represented in tables and bar charts. We represent our results as relative frequencies.

RESULTS

The comparison of the images using C coefficient reports great diversity of dark dorsal spot patterns in the 372 target study frogs, this variability fluctuates from a maximum value $C_A = 59.77\%$ (Fig. 1A) to a minimum value $C_B = 0.86\%$ (Fig. 1B).

Fig. 1

The analysis of the optimized intervals using nonparametric processes allows us to observe the influence of the reported variables on the percentage of dark spots. This optimization drives to establish $C = 19\%$ as the limit between the two groups, individuals with a light spotted pattern due to a low percentage of dark spots $C \leq 19\%$ (CL) and individuals with a dark spotted pattern due to a high percentage of dark spots $C > 19\%$ (CH). Altitude was divided in four categories: 1500 to 1750, 1751 to 2025, 2026 to 2300 and 2301 to 2450 m a. s. l. We sorted out the size of specimens accordingly to their SVL and formed three groups: small frogs ($1.50 \leq \text{SVL} \leq 2.10$ cm), medium-sized frogs ($2.11 \leq \text{SVL} \leq 6.00$ cm) and large frogs ($6.01 \leq \text{SVL} \leq 9.50$ cm) (Table 1, Table 2).

Altitude.—

Altitude ($\chi^2 = 6.956$, $P = 0.073 > 0.05$) does not show a very significant influence on the distribution pattern of dark spots (Table 1). Although, the increase in the altitude from 1500 to 2450 m a. s. l., implies the increase of CH individuals by 27 % (Fig. 2B).

Table 1

Fig. 2

Water body temporality.—

Water body temporality ($\chi^2 = 10.512$, $P = 0.001$) has a significant and greater influence than altitude (Table 1). Temporary water bodies have 17 % more CH individuals than permanent ones (Fig. 2C).

SVL.—

The SVL ($\chi^2 = 15.619$, $P = 0.000$) has the greatest influence among the rest of the studied variables (Table 1). Data analysis shows that 48 % of small and large individuals belong to CH group, exhibiting darker spot patterns. The 27 % of medium-sized individuals belong to CH group and exhibit lighter spot patterns. This means an increase by 21 % of CL medium size lighter spotted individuals (Fig. 2A).

The temporality of the water bodies ($\chi^2 = 50.334$, $P = 0.000$) has a significant influence with the SVL (Table 2). Thus, 65 % of small-sized frogs, 27 % of medium-sized frogs and 8 % of large-sized frogs are located in temporary water bodies (Fig. 2D), the rest of individuals of all sizes remain in permanent water bodies.

Taking in account the nonparametric bivariate correlations in the considered variables, size (SVL) and water body temporality are the ones with the highest Pearson's Rho correlation ($\rho = 0.355$, $P = 0.000$).

Table 2

DISCUSSION

We observed that by increasing the altitude from 1500 to 2450 m a. s. l., the presence of CH individuals increased by 21 % (Fig. 2B). Under the low temperature conditions that occur during the summer at altitudes above 2000 m a. s. l. (where the subalpine and alpine grassland level begins), this 21 % of individuals could have an advantage because their dark-spotted pattern allows them to reach higher temperatures more quickly, as reported by Vences et al. (2002) and Clusella-Trullas et al. (2007). In addition, high-altitudes predators such as crows (*Corvus corax*), stoats (*Mustela*

erminea), vipers (*Vipera aspis*) and water snakes (*Natrix natrix* and *Natrix maura*) depend heavily on these amphibians. Therefore, they may use the dark spots pattern as camouflage throughout the study area, mainly in high altitude open spaces (alpine domain).

We found no differences when considering longitude or latitude. If the variation in latitude is large, 1500 km or more, it modifies the dark spots pattern (Alho et al., 2010). However, the maximum distance between our sampling sites is 7 km.

Ninety-two percent of the larger individuals were located in the permanent water bodies. The vast majority of small individuals (65%) and numerous young individuals (27%) were concentrated in temporary pools (Fig. 2D). This size distribution agrees with previous authors stating that adult frogs use temporary pools for breeding (Miramontes-Sequeiros et al., 2018b).

Small-sized and large-sized individuals have exactly the same distribution in the dark-spotted pattern (48 % CH and 52 % CL) whereas medium-sized individuals are predominantly CL (73 %) (Fig. 2A). Therefore, this dark spots pattern could be related to the ages of the populations as other authors think (Riobo et al., 1999; Alho et al., 2010).

The temporary water bodies, which disappear throughout the sampling month, have 17% more individuals belonging to CH distribution than the permanent water bodies (Fig. 2C). This means a predominance of darker spotted individuals. Drying out pools produce a black substrate. We think a higher percentage of dark spots represents an advantage in this dark environment. This could be due to a camouflage phenomenon, as occurs in *R. septentrionalis* (Kramek and Stewart, 1980) and in toad *Anaxyrus fowleri* (Rabbani et al., 2015).

In conclusion, we found that the distribution pattern of dark spots in the dorsal skin of *R. temporaria* varies with the temporality of the water bodies and the size of the individuals. Frogs located in temporary water bodies present a higher percentage of dark spots compared to those in permanent waters. Temporary ponds dry out during the season, showing a dark substrate; therefore, dark patterns are advantageous in this type of habitat by providing a camouflage mechanism. In addition, they are surrounded by dense vegetation, insuring small frogs with a moist, protective environment. Then, small frogs remain in close proximity to temporary ponds and wetlands. On the other hand, large frogs move away from water bodies in search of prey or migrate to temporary ponds for breeding, so a darker spotted pattern provides them with an excellent camouflage mechanism against predators. Therefore, we conclude that the dorsal dark-spotted patterns in *R. temporaria* is primarily related to camouflage.

DATA ACCESSIBILITY

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

LITERATURE CITED

- Alho, J. S., Herczeg, G., Söderman, F., Laurila, A., Jönsson, K. I., and J. Merilä.** 2010. Increasing melanism along a latitudinal gradient in a widespread amphibian: local adaptation, ontogenic or environmental plasticity? *BMC Evolutionary Biology* 10:317.
- Bagnara, J. T., and J. Matsumoto.** 2006. Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues, p.11-59. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. Second Edition. J. J., Nordlund, R. E., Boissy, V. J., Hearing, R. A., King, W. S., Oetting, and J. P. Ortonne (eds.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

224 **Bagnara, J. T., Taylor, J. D., and M. E., Hadley.** 1968. The Dermal Chromatophore
 225 Unit. *Journal of Cell Biology* 38:67-79.

226 **Bell, R. C., and K. R., Zamudio.** 2012. Sexual dichromatism in frogs: natural
 227 selection, sexual selection and unexpected diversity. *Proceedings of the Royal Society*
 228 B-Biological Sciences 279:4687-4693.

229 **Clusella-Trullas, S., van Wyk, J. H., and J. R. Spotila.** 2007. Thermal melanism in
 230 ectotherms. *Journal of Thermal Biology* 32:235-245.

231 **Dawes, B.** 1941a. The melanin content of the skin of *Rana temporaria* under normal
 232 conditions and after prolonged light- and dark-adaptation. A photometric study. *Journal*
 233 *of Experimental Biology* 18:26-49.

234 **Dawes, B.** 1941b. Pigmentary changes and the background response in *Amphibia*.
 235 *Nature* 147:806-807.

236 **Fernandez, P. J., and J. T. Bagnara.** 1991. Effect of background color and low-
 237 temperature on skin color and circulating alpha-MSH in 2 species of leopard frog.
 238 *General and Comparative Endocrinology* 83:132-141.

239 **GIMP Team.** 2020. Gimp GNU Image Manipulation Program. <https://gimp.org>

240 **Hadley, M., and W. Quevedo.** 1966. Vertebrate Epidermal Melanin Unit. *Nature*
 241 209:1334-1335.

242 **Hoffman, E. A., and M. S. Blouin.** 2000. A review of colour and pattern
 243 polymorphisms in anurans. *Biological Journal of the Linnean Society* 70:633-665.

244 **Kramek, W. C., and M. M. Stewart.** 1980. Ontogenetic and sexual in the pattern of
 245 *Rana septentrionalis*. *Journal of Herpetology* 14:369-375.

246 **Miramontes-Sequeiros, L. C., Palanca-Castán, N., Caamaño-Chinchilla, L., and A.**
 247 **Palanca-Soler.** 2018a. The phenotypic variability in *Rana temporaria* decreases in
 248 response to drying habitats. *Science of the Total Environment* 612:538-543.

Miramontes-Sequeiros, L. C., Palanca-Castán, N., and A. Palanca-Soler. 2018b. Effect of fish stocking on alpine populations of European common frog (*Rana temporaria*) in the Pyrénées National Park. *Herpetological Journal* 28:43-49.

Parker, G. H. 1948. *Animal Color Changes and Their Neurohumours*. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Rabbani, M., Zacharczenko, B., and D. M. Green. 2015. Color Pattern Variation in a Cryptic Amphibian, *Anaxyrus fowleri*. *Journal of Herpetology* 49:649-654.

Riobo, A., Rey, J., Puente, M., Miramontes, C., and M. Vences. 1999. Ontogenetic increase of black dorsal pattern in *Rana temporaria*. *British Herpetological Society Bulletin* 70:1-6.

Roubos, E. W., Van Wijk, D. C. W. A., Kozicz, T., Scheenen, W. J. J. M., and B. G. Jenks. 2010. Plasticity of melanotrope cell regulations in *Xenopus laevis*. *European Journal of Neuroscience* 32:2082-2086.

Rowlands, A. 1952. The influence of water and light upon the color change of sightless frogs (*Rana temporaria*). *Journal of Experimental Biology* 29:127-136.

Vences, M., Galán, P., Vieites, D. R., Puente, M., Oetter, K., and S. Wanke. 2002. Field body temperatures and heating rates in a montane frog population: the importance of black dorsal pattern for thermoregulation. *Annales Zoologici Fennici* 39:209-220.

Figure captions

Fig. 1. Dark dorsal skin patterns in *Rana temporaria*. Maximum coefficient ($C_A = 59.77\%$) and minimum ($C_B = 0.86\%$). C is the percentage of dark spots obtained as the number of black pixels divided by the total number of pixels in the image.

Fig. 2. The bar charts show the relationship between altitude, water body temporality, frog size (SVL) and dark spots distribution pattern in 372 individuals of *Rana temporaria*. The results are expressed in the relative frequencies (%). The percentage of

274 dark spots (C) is divided into two groups: CL as individuals with low percentage of dark
275 spots $C \leq 19\%$, and CH as individuals with high percentage of dark spots $C > 19\%$.
276 Comparison between: C and SVL (A); C and altitude (B); C and water body temporality
277 (C); SVL and water body temporality (D).

ACKNOWLEDGEMENTS

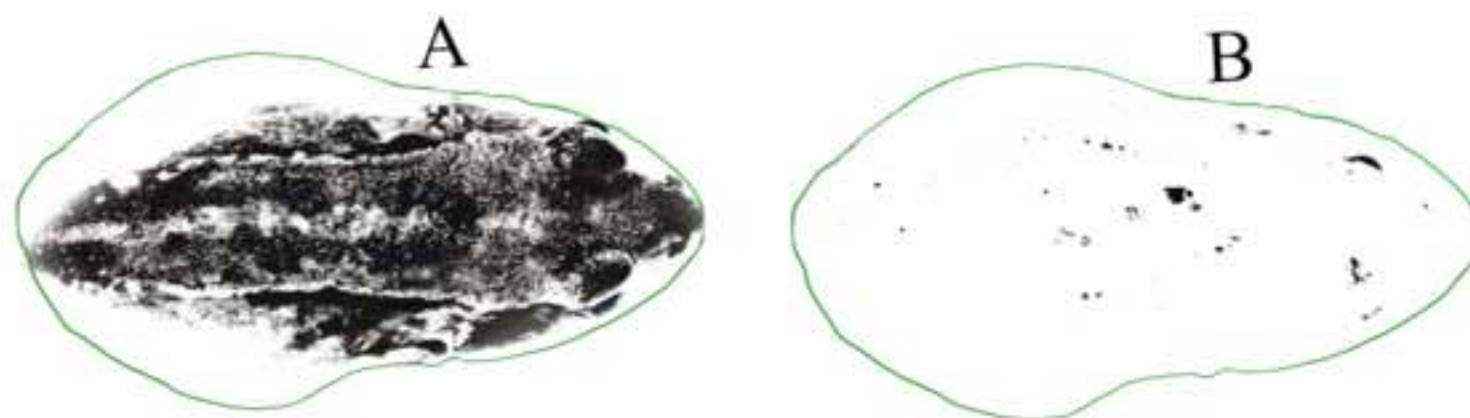
The Animal Anatomy Laboratory Foundation (2020-001) supported this project. We thank Ursicino Abajo, warden of the Respomuso mountain refuge, for his logistic and gastronomic support. We thank the General Directorate of the Natural Environment of the Diputación General de Aragón kindly issued research in frogs' permits for the Pyrenees area.

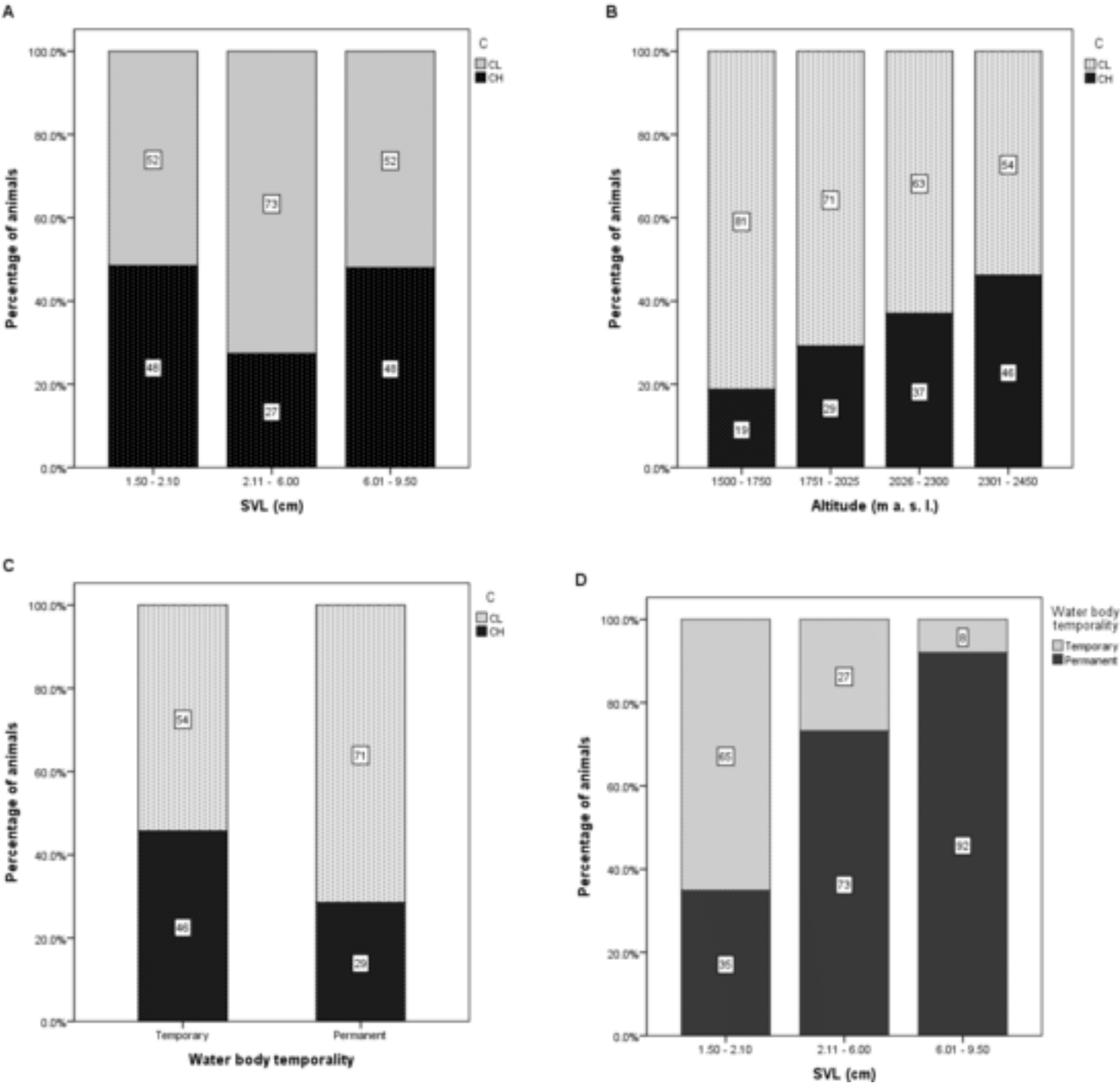
Table 1. Relationship between altitude, water body temporality, frog size (SVL) and dark spot distribution pattern in 372 individuals of *Rana temporaria*. The values in the table are the relative frequencies (%). Each of these variables was divided into different categories according to optimized intervals. We sorted out the percentage of dark spots (C) in two groups: CL as the group of individuals with low percentage of dark spots, $C \leq 19\%$, and CH as the group of individuals with high percentage of dark spots, $C > 19\%$, whose maximum is reached at $C=60\%$. Significance level is expressed as Pearson's Chi-square. These results are displayed in bar charts (Fig. 2.).

Variable	C				Pearson's Chi-square	
	Categories	CL	CH	Total	χ^2	P
Altitude (m a. s. l.) (Fig. 2B)	1500 - 1750	81.25	18.75	100	6.956	0.073
	1751 - 2025	70.87	29.13	100		
	2026 - 2300	63.03	36.97	100		
	2301 - 2450	53.85	46.15	100		
Water body temporality (Fig. 2C)	Temporary	54.31	45.69	100	10.512	0.001
	Permanent	71.48	28.52	100		
SVL (cm) (Fig. 2A)	1.50 - 2.10	51.52	48.48	100	15.619	0.000
	2.11 - 6.00	72.66	27.34	100		
	6.01 - 9.50	52.00	48.00	100		

Table 2. Relative frequencies (%) accounting for the number of individuals located in each water body (temporary/permanent), in relation to the size of individuals (SVL) in a total amount of 372 individuals of *Rana temporaria*. Significance level is expressed as Pearson's Chi-square. Results are displayed in a bar chart (Fig. 2D).

Variable	Water body temporality				Pearson's Chi-square	
	Category	Temporary	Permanent	Total	χ^2	P
SVL (cm)	1.50 - 2.10	65.15	34.85	100	50.334	0.000
(Fig. 2D)	2.11 - 6.00	26.95	73.05	100		
	6.01 - 9.50	8.00	92.00	100		





Anexo 4

Atlas de Flora Pirenaica. Publicado en: Palanca-Soler, A. y Caamaño-Chinchilla, L. (2020). 100 Flores de Alta Montaña Pirenaica. Revista de Fenología y Anatomía, 1-102.



100 flores de alta montaña pirenaica

Antonio Palanca Soler & Laura Caamaño Chinchilla

Rev. fenol. anat.
ISSN 1138-6118
Mayo 2015



Fundación Laboratorio de Anatomía Animal

Sede virtual “Los Silos” en Respomuso
(Sallent de Gállego, Huesca, España)

<http://anatolab.net>



Universidade de Vigo