

Desarrollo y aplicación de una metodología basada en el estudio del ADN ambiental, que permita caracterizar las comunidades de anfibios en el término municipal de Vitoria-Gasteiz en aras de su gestión y conservación

Ingurumen DNAREN azterketetan oinarritutako metodologia bat garatzea eta ezartzea Vitoria-Gasteizko udal barrutian anfibio komunitateak karakterizatu eta, ondoren, kudeatu eta kontserbatu ahal izateko

**INFORME Y MEMORIA
EJECUTIVA
(Noviembre, 2019)**

1. Antecedentes y justificación

En la actual crisis de biodiversidad los ecosistemas de agua dulce están siendo los más afectados, habiéndose reportado una mayor tasa de pérdida de especies y poblaciones en estos sistemas que la estimada para ecosistemas marinos o terrestres (Dudgeon et al., 2006; WWF, 2014). Bajo este escenario, hay una urgente necesidad de mejorar la efectividad de las estrategias usadas para detener la pérdida de biodiversidad, lo cual se ve seriamente dificultado por la falta de herramientas eficientes y fiables para documentar la presencia de especies y evaluar las tendencias de sus poblaciones. De hecho, a la hora de monitorizar ciertos grupos taxonómicos, los métodos existentes hasta la fecha han probado ser ineficientes, incluso invasivos y molestos en algunos casos, o dependientes de expertos taxonómicos que son cada vez más escasos (Wheeler et al. 2004). Sin embargo, recientes avances en las técnicas moleculares han proporcionado una nueva herramienta para la detección del ADN presente en el ambiente o ADN ambiental (eDNA), tanto en sistemas acuáticos como terrestres. El uso de este ADN ambiental, como base para realizar inventarios taxonómicos y evaluar la distribución de las especies, puede ayudar a mejorar la monitorización ambiental y servir de apoyo en la toma de decisiones cuando se llevan a cabo diferentes actuaciones de gestión (Thomsen & Willerslev, 2015). El uso de eDNA ofrece la ventaja de ser no invasivo a la vez que reduce el riesgo de dispersión secundaria involuntaria de especies invasoras y enfermedades. Pero, además, se ha demostrado que los métodos de eDNA poseen una mayor capacidad de detección y rentabilidad en comparación con los métodos tradicionales de monitorización (por ejemplo, Dejean et al. 2012; Biggs et al., 2015).

El estudio de la biodiversidad en los ecosistemas dulceacuícolas puede verse muy beneficiado por el uso esta nueva metodología, tanto para la detección de especies como para la monitorización de sus tendencias. Sin embargo, debido a que se trata de una técnica de reciente utilización, su metodología aun plantea varios retos, en especial, en lo que respecta a la optimización de la estrategia de muestreo así como en cuanto a la fiabilidad y disponibilidad de marcadores moleculares adecuados para la detección de las especies objeto de estudio (Thomsen et al. 2012; Deiner et al. 2015; Miya et al. 2015). Por lo tanto, su aplicación requiere de una minuciosa puesta a punto, adecuando la metodología a los objetivos de cada trabajo.

De los grupos taxonómicos ligados a los ecosistemas de agua dulce, los anfibios (Batrachia), caracterizados por albergar muchas especies discretas, raras y recientemente extintas, son uno de los taxones más vulnerables a nivel mundial (Stuart et al. 2004). En el caso de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), su situación actual también se considera sensible, tal y como refleja el gran número de especies de anfibios incluidas en el Catálogo Vasco de Especies Amenazadas. Por lo tanto, los estudios enfocados a la realización de inventarios taxonómicos

que permitan definir las especies presentes y detallar su distribución, así como el seguimiento de sus poblaciones, son especialmente importantes y necesarios para este grupo de vertebrados. El uso de eDNA para la monitorización de este grupo podría ser particularmente beneficioso ya que la probabilidad de detección mediante métodos tradicionales es a menudo baja para aquellas especies menos abundantes y puede variar enormemente debido a las condiciones ambientales locales (Tanadini & Schmidt, 2011).

2. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es la puesta a punto de una metodología de monitorización de las comunidades de anfibios mediante la técnica de metabarcoding de ADN ambiental que ayude a la gestión de dicho grupo taxonómico. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- A. Diseño de una estrategia de muestreo óptima que permita la detección de anfibios mediante eDNA en masas de agua de distinta tipología.
- B. Diseño y optimización de una metodología de metabarcoding en laboratorio, que permita caracterizar y monitorizar las comunidades de anfibios de los humedales.
- C. Caracterizar las comunidades de anfibios del municipio de Vitoria-Gasteiz en el año 2019 mediante la técnica desarrollada de metabarcoding y comparar los datos obtenidos con los resultados de años previos conseguidos mediante técnicas de muestreo tradicionales.

3. Grupo de investigación

La dirección científica del proyecto será llevada a cabo por el grupo de investigación “**Sistemática, Biogeografía, Ecología del comportamiento y Evolución (SBEcE)**” de la Universidad del País Vasco que, desde su formación en el año 1999, se ha centrado en el campo de la Biología Molecular enfocada al estudio, gestión y conservación de la fauna. De entre los integrantes del grupo, el Dr. **B.J. Gómez-Moliner** será el investigador responsable de la dirección de los trabajos. El Dr. Gómez-Moliner es catedrático en la Facultad de Farmacia y ha formado parte del grupo SBEcE desde su formación, periodo durante el cual ha dirigido 8 tesis doctorales y ha publicado en el área 50 artículos en revistas recogidas en el JCR y otros 27 en revistas científicas no indexadas.

Aparte del Dr. Gómez-Moliner como investigador responsable del proyecto, otras cuatro personas del grupo SBEcE participarán en este estudio. La Dra. **M.J. Madeira**, es doctora en Biología desde el año 2006, fecha desde la que viene disfrutando de diferentes contratos de investigación financiados por la UPV/EHU, dentro del grupo mencionado. Ha sido codirectora

de ocho Tesis Doctorales ya finalizadas y es codirectora de otras dos Tesis en fase de realización. Actualmente es Investigadora Contratada por la UPV/EHU, especialista en biodiversidad así como en gestión y conservación de fauna silvestre. Su investigación se ha centrado desde el inicio en los estudios de taxonomía, especiación y evolución, mediante la aplicación de diferentes técnicas moleculares y combinando múltiples aproximaciones y metodologías de diferentes disciplinas. Sus intereses actuales de investigación se centran en el estudio del eDNA como herramienta para el estudio de la biodiversidad, desarrollando y empleando diferentes técnicas y herramientas. **A. Caro** es una joven doctora integrante del grupo. Defendió su tesis en 2019 bajo la codirección de B.J. Gómez-Moliner y M.J. Madeira sobre sistemática molecular y morfológica, biogeografía y dinámica poblacional del género *Pyrenaearia* (Gastropoda). En la actualidad es Personal Investigador Colaborador con un contrato de investigación por la UPV/EHU. Al igual que M.J. Madeira es una persona experta en las técnicas de Biología Molecular, así como en la utilización de los programas bioinformáticos necesarios. Además, también tiene experiencia en el seguimiento de poblaciones silvestres, tanto en la recogida de datos como en su tratamiento. Los dos últimos colaboradores son investigadores en formación. **E. Somoza** es Licenciado en Ciencias Ambientales y se encuentra en su cuarto año de disfrute de su beca predoctoral acerca de la sistemática del género de moluscos terrestres *Chondrina* utilizando técnicas moleculares por lo que también tiene una amplia experiencia en las técnicas que se emplearán en el presente proyecto. Finalmente, **J. Vázquez** es Licenciado en Ciencias Ambientales y cursará el máster en Biodiversidad, Gestión y Conservación de Ecosistemas de la UPV/EHU en el curso académico 2019/20 realizando su Trabajo de Fin de Máster en el grupo SBECe. También realizó su Trabajo de Fin de Grado con el grupo SBECe durante el cual inició su formación en la Biología Molecular.

4. Tareas realizadas: metodología

4.1. Diseño del protocolo de muestreo

En los sistemas lénticos, el ADN ambiental muestra una distribución parcheada. Esto se debe tanto a una presencia desigual de cada especie en el medio, como a que la dispersión del eDNA se ve limitada horizontalmente por barreras físicas y verticalmente por una estratificación química de la columna de agua. Así pues, a la hora de diseñar la estrategia de recogida de las muestras ambientales en masas de agua lénticas, es necesario tener en cuenta estas características para lograr que las muestras sean representativas de la comunidad de organismos que las habitan y que son objeto de estudio.

En el protocolo diseñado específicamente para este proyecto, las masas de agua se han categorizado en 4 tipos en función de su tamaño (diámetro) para establecer el número de réplicas necesarias por masa para conseguir una representación óptima de cada una de ellas: Tipo 1 < 20 m, Tipo 2 entre 20–50 m, Tipo 3 entre 50–80 m y Tipo 4 > 80 m, recogiendo 1, 2, 3 y 4 réplicas respectivamente. Cada réplica consiste en 250 mL de agua, recogidas mediante varias submuestras de menor volumen tomadas en distintos puntos hasta alcanzar el volumen final, de forma que la periferia de la masa de agua quede muestreada cada 2–3 m (aunque para charcas especialmente grandes o con dificultades para acceder a ciertos puntos, esta distancia puede ser mayor siempre que queden bien representados los distintos hábitats). En los proyectos de monitorización mediante eDNA, un aspecto muy importante a tener en cuenta en el momento de recogida de muestras es la prevención de contaminaciones. Para evitar esta problemática y facilitar el trabajo de campo, se ha diseñado un kit de recogida individualizado para la recolección de cada una de las réplicas, contenido dentro de una bolsa zip hermética y debidamente etiquetada. Cada uno de estos kits de recolección consiste en: (1) un bote de plástico auto-clavado de 250 mL, (2) un bote de plástico auto-clavado de 50 mL, (3) un par de guantes de latex sin polvo, (4) una ficha de campo dentro de una bolsa zip (ver **Anexo 1**) y (5) papel de secado (**Figura 1**). Estos kits deben ser preparados en una zona libre de ADN y se deben llevar siempre preparados al campo. Además de los kits de recogida, el equipo de muestreo en el campo consta de: (1) pinzas telescópicas, (2) nevera de campo con hielos, (3) lejía diluida al 50% en pulverizador, (4) agua destilada en pulverizador, (5) botas de agua y (6) bolsas de basura individuales para el papel de secado desechado, los guantes desechados y los botes de 50 mL reutilizables.



Figura 1. Kit de recolección diseñado para este proyecto.

A continuación se detallan los pasos a seguir para la recolección de muestras ambientales de agua según el protocolo diseñado para nuestro caso de estudio:

1. Determinar el tipo de masa de agua en función de las cuatro categorías establecidas (Tipo 1–4), preparar los kits de recolección necesarios y seleccionar los puntos de muestreo.
2. Mediante el uso de las pinzas telescópicas, para evitar que los muestreadores tengan que introducirse en el agua, recoger en los botes de 50 mL auto-clavados las submuestras de agua que se irán vertiendo en el bote auto-clavado de 250 mL hasta llenarlo (**Figura 2**).
3. Cerrar adecuadamente el bote de 250 mL, secarlo y devolverlo a la bolsa zip.
4. Rellenar la ficha de campo y devolverla dentro de su bolsa zip a la bolsa zip grande del kit de recogida.
5. Desechar los guantes y el papel de secado en sus bolsas específicas. Guardar los botes de 50 mL en su bolsa específica para su posterior descontaminación y reutilización.
6. Una vez recogidas todas las réplicas de una misma masa de agua, depositar las bolsas zip con el bote de 250 mL y la ficha de campo en la nevera de campo, para conservarlas en frío durante la jornada de campo, hasta transportarlas a las instalaciones donde se procederá a su filtrado.
7. Antes de abandonar la masa de agua, descontaminar con lejía diluida al 50% cualquier material (pinzas y botas) que hayan entrado en contacto con el agua. Retirar después los restos de lejía con agua destilada.



Figura2. Recolección de las muestras de agua en el campo: a) y b) recolección de las submuestras de agua con el bote auto-clavado de 50 mL mediante las pinzas telescópicas; c) trasvase de las submuestras al bote auto-clavado de 250 mL.

Una vez recogidas las muestras de agua en el campo, éstas deben ser filtradas dentro de las 24 horas siguientes a su recolección. Para evitar contaminaciones, el filtrado debe llevarse a cabo en una zona bien aireada, ya sea en zonas exteriores o en salas estancas con flujo laminar de aire

y tratamiento UV. Según el protocolo diseñado, las muestras se deben filtrar usando los filtros desechables Nalgene™ con membrana de nitrato de celulosa con poros de 0,45 µm de diámetro y utilizando una bomba de vacío eléctrica (ver **Figura 3** con el montaje de filtrado). Tras desechar el agua filtrada, los filtros de celulosa son retirados de los embudos Nalgene™ utilizando pinzas esterilizadas al fuego (**Figura 4**) y posteriormente se guardan individualizados en botes de 5 mL que se conservarán congelados a -80 °C hasta la posterior extracción del ADN.



Figura 3. Montaje de filtrado con la bomba de vacío eléctrica y el embudo Nalgene™ emplazado en el kitasato mediante un tapón de caucho con un orificio interno de 11 mm.



Figura 4. Retirada del filtro de celulosa del embudo Nalgene™ mediante pinzas esterilizadas al fuego.

Adicionalmente, para algunas de las masas de agua se han recogido también muestras de sedimento, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos mediante ambos tipos de muestra y determinar la adecuación de cada uno a distintos objetivos de estudio. En este caso se ha diseñado un protocolo según el cual las réplicas se deben recoger raspando el sedimento en distintos puntos hasta llenar tubos eppendorf de 2 mL que se conservan en frío durante la jornada de campo y posteriormente serán congelados a -80 °C hasta su posterior extracción de ADN.

4.2. Recolección de las muestras ambientales de agua y sedimento y filtrado de las muestras de agua

Los kits de recolección fueron preparados en el Departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la Facultad de Farmacia (UPV/EHU) por integrantes del grupo de investigación SBECeE, mientras que la recolección de las muestras de agua fue llevada a cabo por el personal del Centro de Estudios Ambientales (CEA) siguiendo el protocolo diseñado entre el 23/05/2019 y el 08/07/2019 y descrito anteriormente. El filtrado de las muestras, fue realizado por integrantes del grupo de investigación de la UPV/EHU en las instalaciones externas de la Facultad de Farmacia para asegurar una buena ventilación que evite posibles contaminaciones.

Por otro lado, la recolección de las muestras de sedimentos fue ejecutada por integrantes del grupo de investigación SBECe.

En total se han muestreado 41 masas de agua del municipio de Vitoria-Gasteiz, resultando en 94 muestras de agua y 10 muestras de sedimento. En la **Tabla 1** se muestra el listado de las masas de agua muestreadas con la relación de réplicas de los distintos tipos de muestra para cada una.

Tabla 1. Masas de agua del municipio de Vitoria-Gasteiz incluidas en el presente proyecto indicando el número de réplicas de los dos tipos de muestra para cada una.

#	Masa de agua	HUSO	X	Y	Altitud (m)	Número de réplicas de agua	Número de réplicas de sedimento
1	Puerto Vitoria I	30T	526183	4736439	777	2	-
2	Puerto Vitoria 3	30T	526293	4736491	785	3	-
3	Balsa de Olarizu	30T	527021	4741442	556	3	-
4	Laguna del Jardín Botánico	30T	527356	4742059	544	4	-
5	Balsa de Larregana – Salburua	30T	529664	4745606	511	3	2
6	Balsa de Arkaute	30T	529952	4745243	511	4	-
7	Laguna Parque Zabalzana 2	30T	522993	4744147	522	2	-
8	Parque Zabalzana I	30T	523067	4744030	524	4	-
9	Balsa de Betoño	30T	528684	4745229	512	4	3
10	Balsa de Duranzarra	30T	529152	4745139	515	4	2
11	Ataria W	30T	529190	4745269	513	1	-
12	Ataria E	30T	529316	4745290	512	2	-
13	Balsa Orgaz	30T	523366	4739188	722	2	-
14	Armentia 2	30T	524443	4742076	548	3	-
15	Bosque Armentia	30T	523751	4741538	574	3	-
16	Laguna Lezea	30T	523178	4743419	523	3	-
17	Balsa Aberasturi	30T	534248	4738983	651	4	-
18	Balsa Villafranca	30T	534343	4739326	642	4	-
19	Botrino 2	30T	534592	4737346	795	1	-
20	Botrino 5	30T	534645	4737355	795	2	-
21	Palogan 1	30T	532810	4735920	773	1	-
22	Palogan 2	30T	532771	4735908	775	1	-
23	Palogan 5	30T	532686	4735885	780	1	-
24	Palogan 6	30T	532644	4735881	785	1	-
25	Palogan 7	30T	532560	4735884	765	2	-
26	Palogan 8	30T	532472	4735808	772	1	-
27	Puerto Vitoria V	30T	526331	4736579	761	1	-
28	Puerto Vitoria VI	30T	523618	4736607	760	1	-
29	Larraisabel I	30T	525829	4736736	752	3	-
30	Larraisabel X	30T	525908	4736778	749	3	-
31	Larraisabel XII	30T	525937	4736838	742	3	-
32	Larraisabel XIV	30T	525855	4736905	736	2	-
33	Pieza Vitoria II	30T	527127	4736772	783	1	-
34	Gamarra II	30T	528849	4747575	511	1	-
35	Junguitu II	30T	532749	4746522	518	2	-
36	Balsa Lubiano I	30T	534676	4748601	539	3	-
37	Pozo de Laku	30T	528939	4748017	511	-	3
38	Yurre	30T	524373	4746952	511	2	-
39	Aranguiz	30T	533828	4748094	507	2	-
40	Balsa Riego Ullibarri-Viña	30T	518904	4747190	526	3	-
41	Laguna Ullibarri-Viña	30T	519407	4747799	534	2	-

4.3. Extracción de ADN de las muestras ambientales de agua y sedimento

La extracción de ADN de las muestras ambientales se realizó en una estancia con flujo laminar de aire, tratamiento UV y libre de ADN procedente de especies acuáticas, con el fin de evitar cualquier fuente de contaminación externa. La extracción de las muestras de agua se efectuó mediante el kit comercial *DNeasy PowerWater Kit* de Qiagen (Hombrechtikon, Switzerland) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras de sedimento se extrajeron con el kit comercial *Dneasy PowerSoil Kit* de la misma marca. Además, para poder comparar los resultados, en función del método de extracción empleado, algunas de las muestras de sedimento también se extrajeron con los kits comerciales *NucleoSpin® Soil DNA Isolation kit* de Machery-Nagel y *Soil DNA Isolation Plus Kit®* de Norgen Biotek.

4.4. Creación de una base de datos de secuencias de ADN del *locus* seleccionado

A la hora de poner en marcha cualquier estudio de ADN ambiental, es muy importante contar con una base de datos representativa del marcador molecular elegido de las especies objeto del estudio para: (i) determinar si el marcador seleccionado es suficientemente polimórfico para diferenciar las diferentes especies y (ii) tener una base de datos de referencia sobre la que comparar las secuencias de ADN obtenidas en las muestras analizadas. Para este proyecto se ha seleccionado un fragmento de ADN de 60 pares de bases (pb) de la región *12S* del ADN mitocondrial utilizado previamente con éxito en anfibios por Valentini et al. (2016). Para construir la base de datos de referencia, en primer lugar se obtuvieron las matrices de secuencias obtenidas por Valentini et al. (2016) para este *locus* en concreto. Además, se realizó una búsqueda de secuencias de este *locus* para todo el grupo Batrachia en la base de datos pública GenBank, añadiendo las secuencias encontradas a las matrices de Valentini et al. (2016). Finalmente, para lograr una mayor especificidad, se lograron secuencias del marcador molecular seleccionado para 59 muestras de tejido de 16 especies de anfibios de la península ibérica (incluyendo más de un representante por especie para capturar toda la variabilidad intraespecífica) provenientes de las colecciones del Instituto Alavés de la Naturaleza (IAN), de la Sociedad de Ciencias Aranzadi (SCA), del Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN) y del Departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la Universidad del País Vasco (**Tabla 2**). El ADN genómico de estas muestras de tejido fue extraído mediante el kit comercial *DNAeasy Tissue Kit* de Qiagen. Tras la amplificación mediante PCR simple del *locus*, la secuenciación se llevó a cabo en la empresa MacroGen Spain (Madrid) empleando un secuenciador ABI3730XL o ABI3700. Finalmente, las secuencias *forward* y *reverse* resultantes se ensamblaron y corrigieron usando el programa Geneious 8.0.2 (Kearse et al., 2012).

Tabla 2. Muestras de tejido de anfibios de la península ibérica, agrupadas por especies y empleadas para la construcción de la base de datos de secuencias de ADN del *locus* 12S seleccionado para este estudio.

Especie	Código	Localidad	Provincia	Colección
<i>S. salamandra</i>	Ssal-01	PN Valderejo	Araba	SCA
	Ssal-02	Lekunberri	Nafarroa	SCA
	Ssal-03	Artikutza (Goizueta)	Nafarroa	SCA
	Ssal-04	Encharcamientos Unguino	Araba	IAN
<i>L. helveticus</i>	Lhel-01	Oiartzun	Gipuzkoa	SCA
	Lhel-02	Badostáin	Nafarroa	SCA
	Lhel-03	Altube	Araba	IAN
<i>T. marmoratus</i>	Tmar-01	PN Valderejo	Araba	SCA
	Tmar-02	Sierra Andía	Nafarroa	SCA
	Tmar-03	Arguedas	Nafarroa	SCA
	Tmar-04	--	Araba	IAN
<i>I. alpestris</i>	Ialp-01	Sierra Andía	Nafarroa	SCA
	Ialp-02	Sierra Sálvada	Araba	SCA
	Ialp-03	Encharcamientos Unguino	Araba	IAN
<i>D. galganoi</i>	Dgal-01	Fontecha	Araba	MNCN
	Dgal-02	Fontecha	Araba	SCA
	Dgal-03	Pechón	Cantabria	MNCN
	Dgal-04	Fuentes de Valdepero	Palencia	MNCN
	Dgal-05	Puentelarra	Araba	EHU
	Dgal-06	Puentelarra	Araba	EHU
	Dgal-07	Puentelarra	Araba	EHU
<i>A. obstetricans</i>	Aobs-01	Pamplona	Nafarroa	SCA
	Aobs-02	--	Araba	IAN
	Aobs-03	Heredia	Araba	IAN
<i>P. punctatus</i>	Ppun-01	Sierra Sálvada	Araba	SCA
	Ppun-02	Herramélluri	La Rioja	SCA
<i>P. cultripes</i>	Pcul-01	Lacorzana	Araba	SCA
	Pcul-02	Sesma	Nafarroa	SCA
<i>E. calamita</i>	Ecal-01	Lapuebla de Labarca	Araba	SCA
	Ecal-02	Fustiñana	Nafarroa	SCA
	Ecal-03	Herramélluri	La Rioja	SCA
	Ecal-04	Buruaga	Araba	IAN
	Ecal-05	Txingudi	Gipuzkoa	EHU
	Ecal-06	Txingudi	Gipuzkoa	EHU
<i>B. spinosus</i>	Bspi-01	Oiartzun	Gipuzkoa	SCA
	Bspi-02	Irún	Gipuzkoa	SCA
	Bspi-03	Ordoñana	Araba	IAN
	Bspi-04	Luzuriaga	Araba	IAN
	Bspi-05	Irún	Gipuzkoa	EHU
	Bspi-06	Irún	Gipuzkoa	EHU
<i>H. molleri</i>	Hmol-01	Valgañón	La Rioja	SCA
	Hmol-02	PN Valderejo	Araba	SCA
	Hmol-03	Sierra Lóquiz	Nafarroa	SCA
<i>R. temporaria</i>	Rtem-01	Lekunberri	Nafarroa	SCA
	Rtem-02	Lizaso	Nafarroa	SCA
	Rtem-03	Orio	Gipuzkoa	SCA
	Rtem-04	Lizaso	Nafarroa	EHU
<i>R. dalmatina</i>	Rdal-01	Amurrio	Araba	SCA
	Rdal-02	Gorbea	Araba	SCA
	Rdal-03	Berberana	Burgos	SCA
	Rdal-04	Bigandi, Urkabustaiz	Araba	IAN
	Rdal-05	Laño	Burgos	EHU
	Rdal-06	Berrioplano	Nafarroa	EHU
<i>P. perezi</i>	Pper-01	Pamplona	Nafarroa	SCA
	Pper-02	Bikuña	Araba	IAN
<i>R. iberica</i>	Ribe-01	Monsagro	Salamanca	EHU
	Ribe-02	Monsagro	Salamanca	EHU
<i>R. pyrenaica</i>	Rpyr-01	--	Aragón	EHU
	Rpyr-02	--	Aragón	EHU

5. Tareas a realizar

A partir de Noviembre de 2019 se va a proceder a la secuenciación de las muestras ambientales mediante técnicas de secuenciación masiva. La secuenciación masiva se realizará a través del Servicio de Genómica de la UPV (Sgiker – UPV/EHU) en la plataforma Illumina (Sistema de secuenciación NextSeq™ 550). Los resultados obtenidos de Sgiker serán sometidos al correspondiente análisis bioinformático. Se utilizará el programa USEARCH v.11 (Edgar, 2010) para el preprocesado de los resultados brutos de Illumina, el cual consistirá en el ensamblaje de los *reads forward* y *reverse*, la eliminación de las secuencias de *primers*, el filtrado de calidad y el agrupamiento en OTUs (Unidades Evolutivas Operacionales) de aquellos *reads* procesados con una similitud > 99%. La asignación taxonómica de las OTUs también se realizará mediante USEARCH usando para ello la base de datos de construcción propia de las especies de anfibios de la península ibérica. Finalmente, una vez identificadas las OTUs se utilizará el paquete de R *hilldiv* (Alberdi & Gilbert, 2019) para realizar estimas de diversidad de las distintas masas de agua y comparar estadísticamente el grado de similitud/disimilitud entre ellas. Además de los OTUs, se realizará una comparativa directa del total de secuencias obtenidas frente a bases de datos conocidas, con el fin de obtener una relación completa de los organismos detectados en cada una de las muestras analizadas.

Este estudio se engloba dentro de un proyecto más amplio que pretende poner a punto distintas metodologías basadas en el estudio del ADN ambiental para la monitorización de la biodiversidad en masas de agua lénticas, que sean ampliamente aplicables en distintos territorios, ajustables a problemáticas concretas y extensibles a otros grupos taxonómicos. Así, aparte de testar la utilidad del metabarcoding para la caracterización de las comunidades de anfibios, también se pretende comprobar la aplicabilidad de las PCR cuantitativas (qPCR) para la detección de especies concretas, en especial aquellas con una muy baja presencia o catalogadas como especies amenazadas.

En concreto, a la hora de desarrollar esta técnica se utilizará el sapillo pintojo (*Discoglossus galganoi*) como especie modelo. Para poder hacer frente a la totalidad del proyecto, el grupo de investigación SBECe de la UPV/EHU cuenta también con financiación proveniente de la subvención del Gobierno Vasco para entidades privadas que realicen proyectos para la generación de conocimiento en la conservación del Patrimonio Natural, convocatoria de 2019.

6. Bibliografía

- Alberdi, A. & Gilbert, M.T.P., 2019. A guide to the application of Hill numbers to DNA based diversity analyses. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13014>
- Biggs, J. et al., 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183, 19-28.
- Deiner, K. et al., 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation* 183, 53–63.
- Dejean, T. et al., 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49, 953–959.
- Dudgeon, D. et al., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews* 81(2), 163-182.
- Edgar, R., 2010. Usearch. Lawrence Berkeley National Lab (LBNL), Berkeley, CA (United States).
- Kearse, M, et al., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649.
- Miya, M. et al., 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science* 2(7), 150088.
- Stuart, S.N. et al., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783–1786.
- Tanadini, L.G. & Schmidt, B.R., 2011. Population size influences amphibian detection probability: implications for biodiversity monitoring programs. *PLoS ONE* 6, e28244.
- Thomsen, P. F. & Willerslev, E., 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183, 4-18.
- Thomsen, P. F. et al., 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21(11), 2565-2573.
- Valentini, A. et al., 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25, 929–942.
- Wheeler, Q.D. et al., 2004. Taxonomy: impediment or expedient? *Science* 303, 285.
- WWF, 2014. Living Planet Report 2014: Summary. (eds McLellan R, Iyengar L, Jeffries B, Oerlemans N), WWF, Gland, Switzerland.

7. Anexos

Anexo 1. Ficha de campo incluida dentro del kit de recogida.

Masa de agua:		Tipo: (1-4)	
		Réplica:	
Recolector:			
Fecha:		Hora:	
Esquema de la masa de agua con localización de los puntos de recogida:			
Observaciones:			
Fotos:			