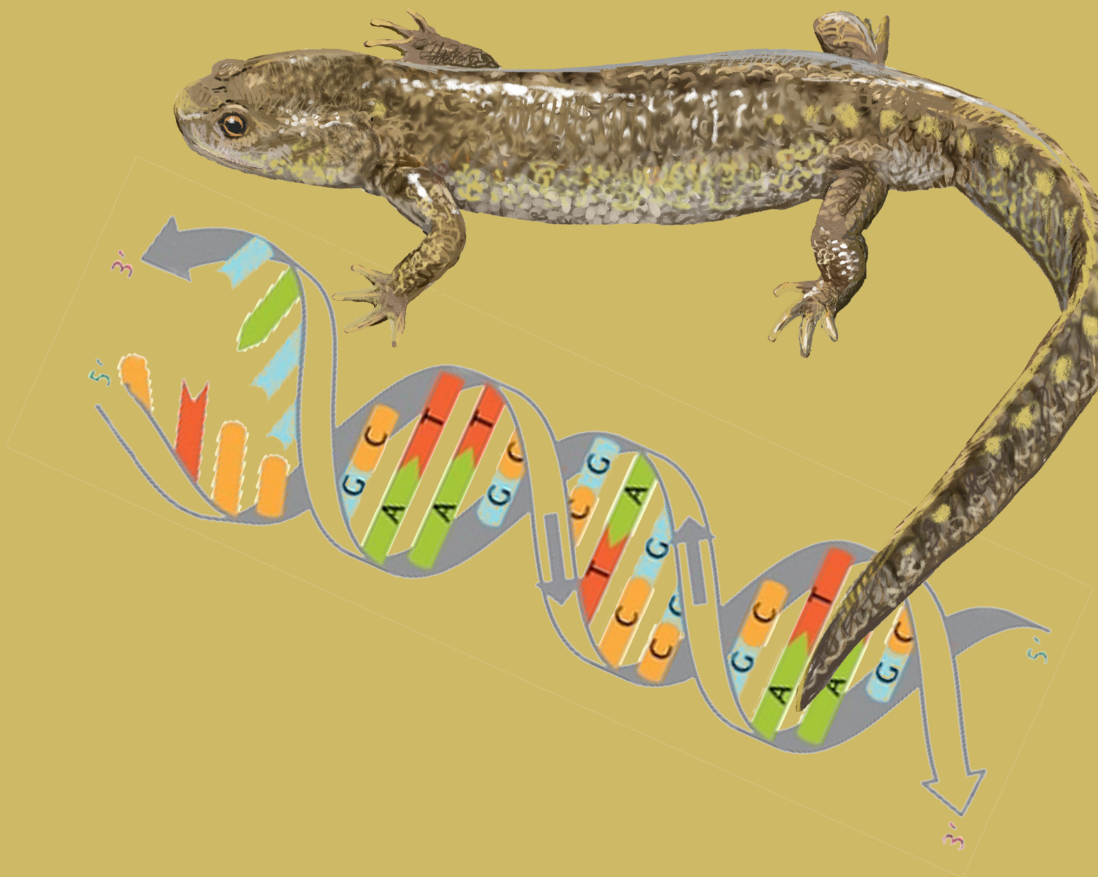
Tesi doctoral

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



Emilio Valbuena Ureña

2015

Fonts de les fotografies de la portada

Tritó del Montseny: Toni Llobet

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

Aquesta tesi ha estat desenvolupada amb el suport de:

Generalitat de Catalunya
Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural
FORESTAL CATALANA
MILOCA
ZOO Barcelona
Ajuntament de Barcelona
MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD

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

Tesi doctoral

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

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

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

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

La tutora
Maite Carrassón López de Letona
Universitat Autònoma de Barcelona

El doctorand
Emilio Valbuena Ureña

Bellaterra, Juliol 2015

A l'Anna, a la Berta i al Bernat

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

Kashmiri proverb

AGRAÏMENTS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

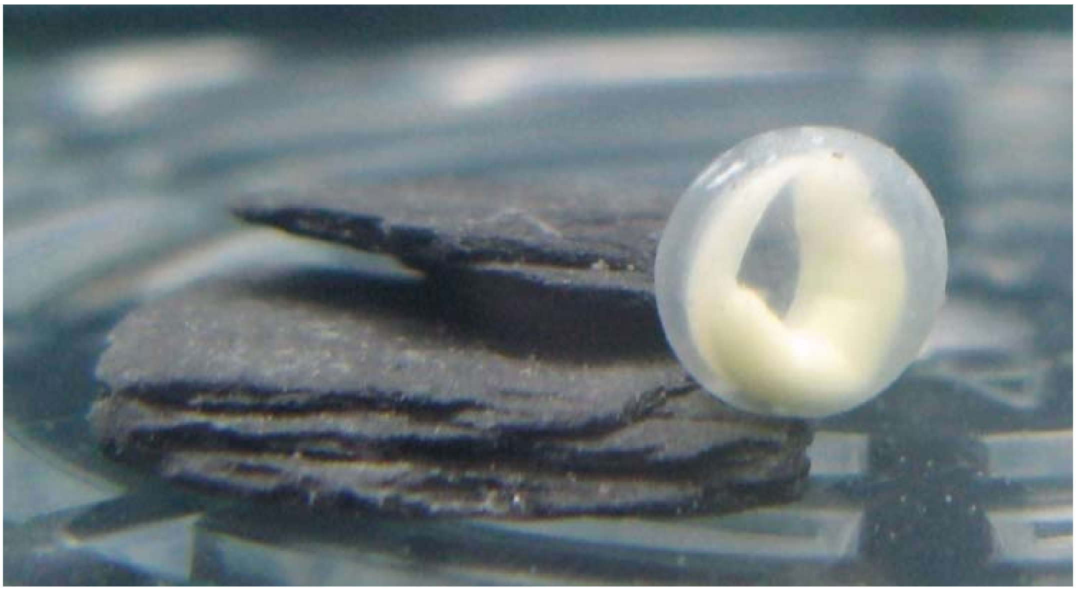
In the end we will conserve only what we love; we will love only what we understand; and we will understand only what we are taught

Baba Dioum, 1968

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

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

Gary Snyder



I. ABSTRACT/RESUM

Many scientists agree that we are achieving the midst of the sixth great mass extinction, what it has been named as “biodiversity crisis”. Anthropogenic pressure is affecting both directly or indirectly natural environments. The amphibians are one of the most severally affected groups, and are the only ones catalogued globally at risk. The climate change, pollution, emerging diseases, habitat loss, introduction of invasive species and harvesting are probably the main factors that have contributed most to the overall decline of this group; in fact, surely the global decline of amphibians is due to the synergy of these factors. In that sense, conservation genetics will be a crucial tool for managing these endangered species. The main concern of this discipline is the identification and protection of the evolutionary potential of endangered species through understanding the importance of genetic diversity in preventing the extinction of species. The loss of genetic diversity and changes in the genetic structure can affect the long-term survival of a species, especially in small and endangered populations. One of the main threats affecting small populations is inbreeding depression due to genetic drift. This could drive the species to the extinction vortex. Molecular markers are a very useful tool in conservation genetics to evaluate and manage the genetic state of these populations. The Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) is one of the most endangered vertebrates in Europe and it is classified as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). This species is endemic to the Montseny Natural Park (NE Iberian Peninsula). Its disconnected populations are found within a restricted altitudinal range in seven geographically close brooks, occupying a total area of 8 km^2. Moreover, its habitat is fragmented into two main sectors (eastern and western) on both sides of the Tordera river valley and separated by unsuitable terrestrial habitat. The current census population size of this species has been estimated at less than 1500 adult individuals. Recent human activities such as the extraction of large amounts of water for commercial purposes, deforestation and the building of tracks and roads are disturbing the habitat and are affecting the species negatively. The main goal of this thesis is to provide basic knowledge about the genetics of the Montseny brook newt to contribute towards the conservation of this emblematic species. The main aim of this thesis is to identify the different management units in order to apply appropriate conservation measures. To achieve this goal, we have explored the biogeography of the species (Chapter IV), the design of polymorphic markers (Chapter V), the characterization and genetic structure of its populations (Chapter VI) and the ex situ reproductive program (Chapter VII) by analyzing sequence data of two genes, one mitochondrial and one nuclear, together with 24 microsatellite markers. Within this thesis, we confirm the validity of the two species of *Calotriton*. Despite the limited distribution range of the Montseny brook newt compared to its sister species, the Pyrenean brook newt, *C. arnoldi* presents a high genetic structure. The morphological and molecular analyses suggest two geographically distinct population groups, to the east and west of the Tordera river valley, with no gene flow between them. The fifteen polymorphic loci

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

Molts científics estan d'acord que estem enmig de la sisena gran extinció en massa, el que s'ha anomenat com la crisi de la biodiversitat. La forta pressió antropogènica està afectant ja sigui directament o indirectament els ambients naturals. Els amfibis són un dels grups més afectats i són els únics catalogats globalment en perill. El canvi climàtic, la contaminació, les malalties emergents, la pèrdua d'hàbitat, la introducció d'espècies invasores i la seva explotació són probablement els principals factors que més han contribuït a la disminució general d'aquest grup; de fet, el declivi global dels amfibis és segurament causa de la sinergia d'aquests factors. En aquest sentit, la genètica de conservació és una eina fonamental a considerar en la gestió d'aquestes espècies en perill d'extinció. La principal preocupació de la disciplina és la identificació del potencial evolutiu de les espècies en perill, a través de la comprensió de la importància de la diversitat genètica en la prevenció de l'extinció d'espècies. La pèrdua de la diversitat genètica i els canvis en l'estructura genètica poden afectar la supervivència a llarg termini d'una espècie, sobretot en petites poblacions en perill d'extinció. Una de les principals amenaces que afecten les petites poblacions és la depressió endogàmica causada per la deriva genètica. Això podria conduir a l'espècie al vòrtex d'extinció. Els marcadors moleculars han estat considerats una eina útil en la genètica de la conservació per tal d'avaluar i gestionar l'estat genètic d'aquestes poblacions. El tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) és un dels vertebrats més amenaçats d'Europa i està classificat com en perill crític per la Unió Internacional per a la Conservació de la Naturalesa (IUCN). Aquesta espècie és endèmica del Parc Natural del Montseny (NE de la Península Ibèrica). Les seves poblacions desconnectades es troben dins d'un rang altitudinal restringit en set torrents propers geogràficament, ocupant una superfície total de 8 km^2. A més, el seu hàbitat està fragmentat en dos sectors principals (oriental i occidental) a banda i banda de la vall del riu Tordera, i separats per hàbitat terrestre inadequat. El cens actual poblacional d'aquesta espècie ha estat estimat en menys de 1.500 individus adults. L'activitat humana recent, com l'extracció de grans quantitats d'aigua per a fins comercials, la desforestació i la construcció de pistes i camins estan pertorbant l'hàbitat i estan afectant negativament a aquesta espècie. L'objectiu principal d'aquesta tesi és proporcionar coneixements bàsics sobre la genètica del tritó del Montseny perquè siguin útils per a la conservació de l'espècie. Aquesta tesi pretén ser d'utilitat en la identificació de les diferents unitats de gestió i l'aplicació de mesures de conservació. Per aconseguir aquest objectiu principal, s'ha explorat la biogeografia de l'espècie (Capítol IV), s'ha dissenyat nous marcadors microsatèl·lits polimòrfics (Capítol V), s'ha caracteritzat i estudiat l'estructura genètica de les seves poblacions (Capítol VI) i s'ha avaluat el programa ex situ (Capítol VII), mitjançant l'anàlisi de dades de seqüència de dos gens, un mitocondrial i un nuclear, juntament amb 24 marcadors microsatèl·lits. Dins d'aquesta tesi, confirmem la validesa de les dues espècies de *Calotriton*. Malgrat que el rang de distribució del tritó del Montseny és limitat, en comparació amb la seva espècie germana el tritó pirinenc *C. asper*, *C. arnoldi* presenta un alt grau d'estructuració

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

II. INTRODUCCIÓ

Nature is not a place to visit. It is home

Gary Snyder

1. ELS AMFIBIS I LA CRISI DE LA BIODIVERSITAT

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

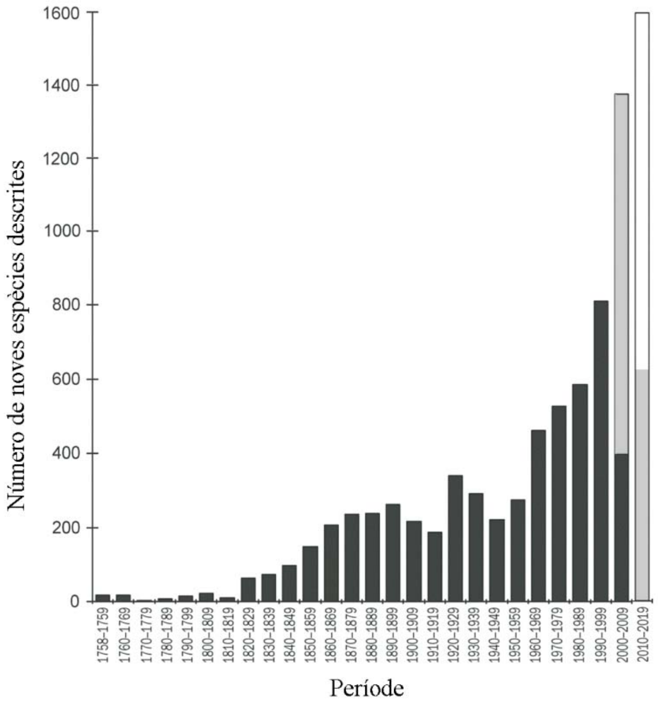


Figura 1. Descripció de noves espècies d'amfibis per dècades a escala mundial (modificat de Köhler *et al*. 2005). Les columnes negres mostren les dades fins al 2003 (Köhler *et al.* 2005), les columnes en gris mostren el període 2004-2014 (AmphibiaWeb 2015), i la columna en blanc correspon a l'expectativa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

Aquest interès en el grup, però, ha contribuït en donar a conèixer el preocupant estat de conservació en què es troba. L'alarma va sorgir als anys 80 quan la comunitat científica va evidenciar una desaparició generalitzada de les poblacions d'amfibis, inclús en zones ben conservades (Angulo *et al.* 2006). En un inici aquesta preocupació va ser presa amb escepticisme per la fluctuació natural que poden patir les poblacions d'amfibis (Pechmann i Wilbur 1994). La primera avaluació exhaustiva de l'estat de conservació d'aquest grup publicada per Stuart *et al.* (2004) va determinar la magnitud de la crisis. Segons aquest treball, de les 5743 espècies reconegudes fins llavors, gairebé un terç estaven globalment amenaçades, és a dir, catalogades per la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) com a vulnerable, en perill o en perill crític. Aquesta situació és més crítica que en d'altres grups com les aus o els mamífers, on trobem en situació d'amenaça el 12% i el 23% de les espècies respectivament. A més, en els amfibis, el 43.2% de les espècies estan en declivi i gairebé el 30% estan poc estudiades i se'n desconeix la seva situació. Tot i que aquesta avaluació s'ha reafirmat recentment (Hoffmann *et al.* 2010), aquests percentatges s'han de considerar com estimacions aproximades com a conseqüència del ràpid ritme de descripció de noves espècies – espècies per tant no avaluades – i a la gran proporció d'amfibis amb dades insuficients per determinar el seu estat de conservació. Així, els nous descobriments si bé poden contribuir a la riquesa general d'espècies d'amfibis, podrien també fer que augmentés la proporció d'amfibis amenaçats. A més, la predicció del risc d'extinció de les espècies d'amfibis catalogades per la IUCN com a "dades insuficients" mostra que aquestes espècies poden estar més amenaçades que les espècies ja avaluades (Howard i Bickford 2014). Estudis recents han demostrat que la taxa de disminució i extinció dels amfibis no té precedents, sent la taxa d'extinció mitjana de les últimes dècades unes 200 vegades més gran que la dels últims 350 milions d'anys (Roelants *et al.* 2007). Així, és evident doncs la necessitat de conservar aquest grup.

Vulnerabilitat dels amfibis

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

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

Causes del declivi

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

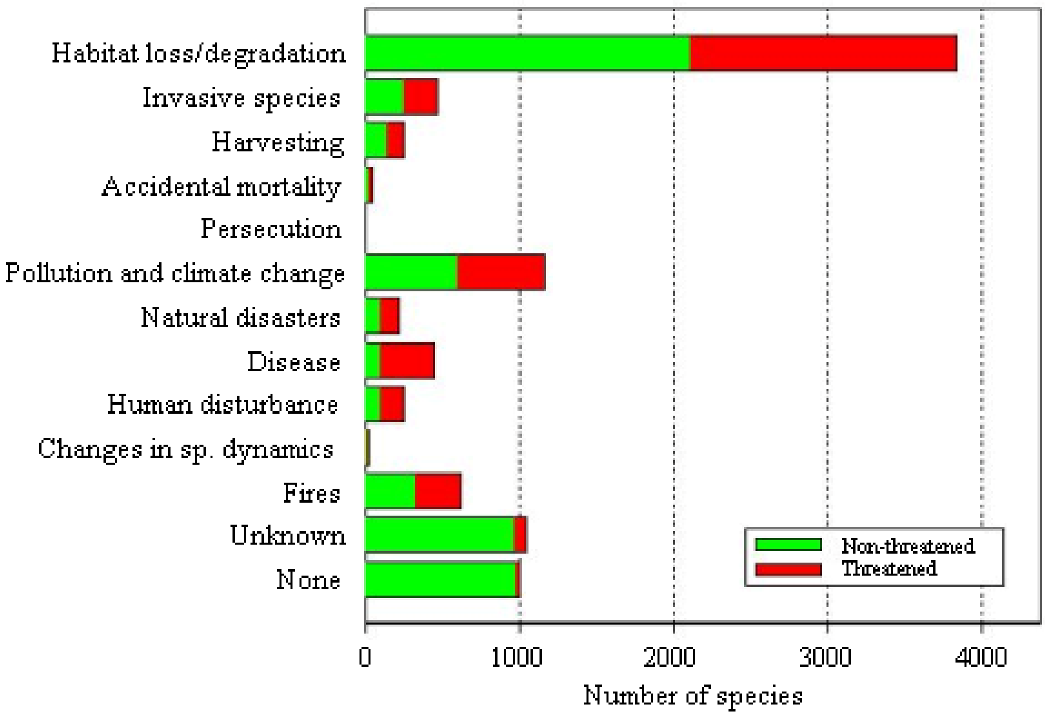


Figura 2. Principals factors d'amenaça dels amfibis a nivell mundial. Font: IUCN (2008).

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

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

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

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

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

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

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

La biologia de la conservació és una ciència multidisciplinar que aborda moltes d'aquestes qüestions preliminars, integrant diverses disciplines amb l'objectiu comú de mantenir la biodiversitat. Tot i que la conservació de la biodiversitat depèn principalment de la protecció del medi ambient i del manteniment de l'hàbitat, la genètica de la conservació és una disciplina que juga un paper molt important dins la biologia de la conservació. La preocupació fonamental d’aquesta disciplina és la identificació i protecció del potencial evolutiu de les espècies amenaçades, a través de la comprensió de la importància de la diversitat genètica en la prevenció de l’extinció d’espècies (Frankham *et al.* 2010). La pèrdua de diversitat genètica i els canvis en l’estructura genètica poden afectar la supervivència a llarg termini d’una espècie. La genètica de poblacions és un punt clau per entendre aquests processos. En la majoria dels casos, la retenció de la variació genètica i potencial evolutiu associat ha de ser un aspecte essencial a tenir en compte en la conservació de les poblacions i espècies (Wan *et al.* 2004). La variació genètica facilita el canvi evolutiu dins les poblacions, el que permet a les espècies evolucionar en resposta als canvis ambientals.

La importància de la genètica en poblacions petites

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

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

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

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

La ID és sovint el resultat d'un coll d'ampolla poblacional. Un coll d'ampolla és la contracció significativa dels efectius d'una població durant un curt període de temps a causa d'algun esdeveniment ambiental a l'atzar. En un veritable coll d'ampolla poblacional, les probabilitats de supervivència de qualsevol membre de la població són purament aleatòries, i no pas per cap avantatge genètica inherent particular. El coll d'ampolla pot donar lloc a canvis radicals en les freqüències al·lèliques, completament independents de la selecció natural. Després d'un coll d'ampolla, l'espècie experimenta les mateixes conseqüències que en l'efecte fundador. En aquestes, s’estableix una nova població a partir d’un reduït nombre d'individus, transportant només una petita fracció de la variació genètica de la població original. Això donarà lloc a la pèrdua de variació genètica, així com l’augment de l’endogàmia entre el reduït número de fundadors, factors que contribueixen, de nou, a la depressió endogàmica.

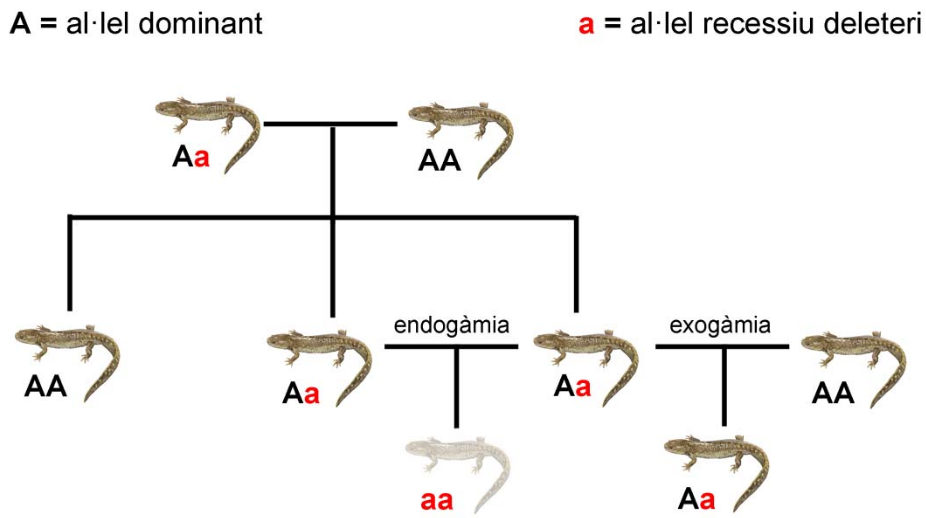


Figura 3. Exemple de depressió per endogàmia. Els al·lels deleteris recessius es fan més patents en creuament endogàmics.

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

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

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

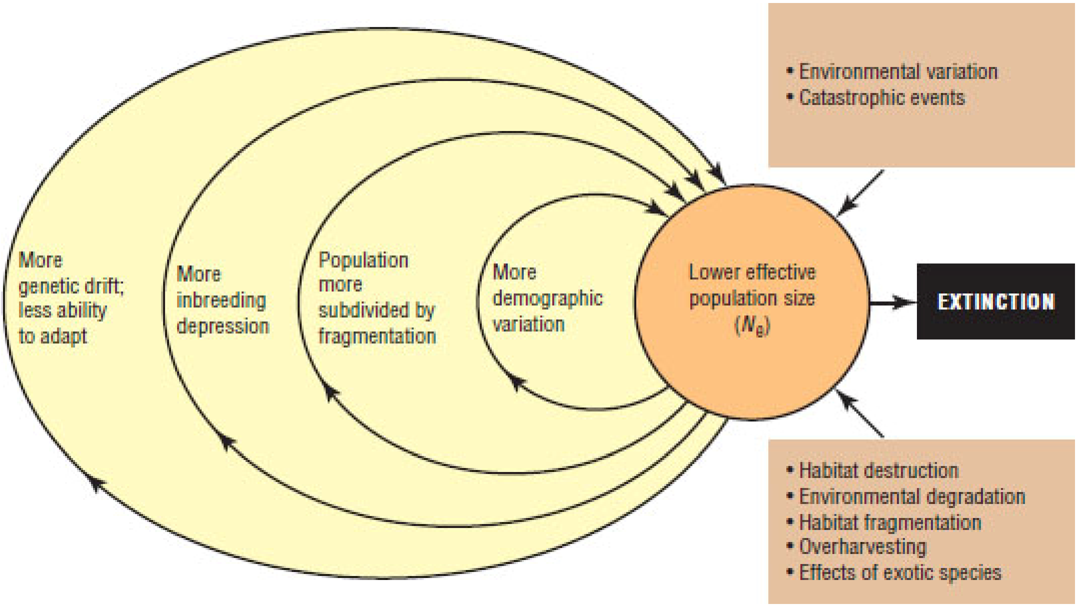


Figura 4. Diagrama del vòrtex de l'extinció. Una vegada l'espècie entra en l'espiral, les seves poblacions disminueixen progressivament, el que a la vegada, provoca efectes negatius sobre aquestes fent més aguda la disminució. Font: Primack i Bacon (2011).

La genètica de conservació en la gestió ex situ

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

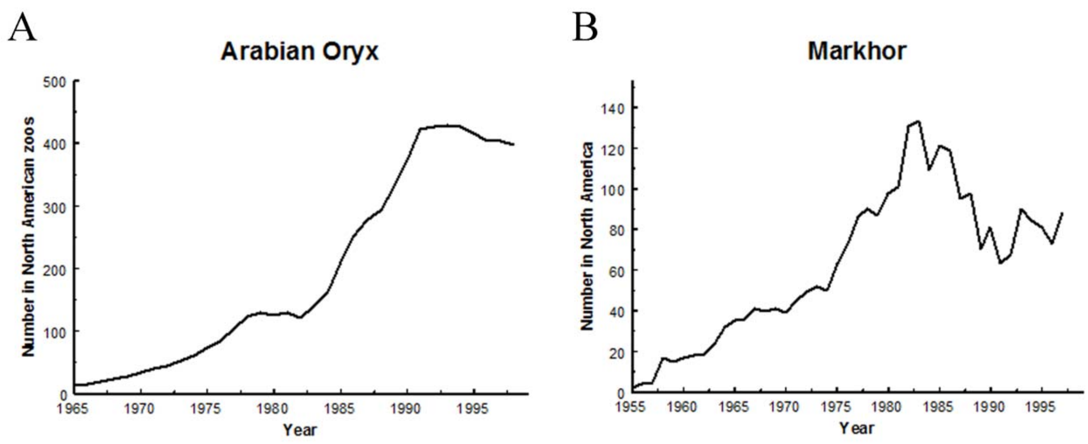


Figura 5. Exemple de la diferència en els resultats obtinguts en dos programes de cria en captivitat de dos bòvids amenaçats. Una bona gestió demogràfica i genètica del programa ex situ de l'orix aràbic (*Oryx leucoryx*)(A); programa ex situ amb escassa gestió del marjor (*Capra falconeri*)(B). Font: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

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

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

A més a més, alhora de crear un nou programa de cria en captivitat no només s'haurà de procurar maximitzar la conservació de la diversitat genètica salvatge, sinó també mantenir el potencial evolutiu de l'espècie. En aquest sentit, s'ha de tenir en compte que en moltes espècies l'existència d'unitats intraespecífiques amb suficient divergència evolutiva fa que s'hagi de requerir una conservació independent entre aquestes. En aquests casos, serà important determinar les unitats de maneig captives i determinar-ne la seva gestió futura. Al gestionar una espècie amenaçada que presenta diferents línies evolutives, no només ens enfrontem a la depressió per endogàmia dins de cada població aïllada, com anteriorment s'ha explicat, sinó que també s'ha de plantejar si l'espècie pot patir depressió per exogàmia (*outbreeding depression*, OD), ja que la barreja de poblacions aïllades divergents pot portar conseqüències negatives (Figura 6). Mentre que els efectes de la ID estan àmpliament estudiats, els efectes de l'OD no ha estat gaire empíricament demostrats, ja que aquests es poden manifestar en una segona generació, inclús després d'haver-se observat heterozigosi a la primera generació (Edmands 2007). Els amfibis, donades les altes diferenciacions genètiques que sovint presenten entre poblacions, podrien ser particularment sensibles a l'OD (Sagvik *et al.* 2005). L'OD es dóna quan la descendència dels encreuaments entre individus de diferents llinatges tenen condicions físiques i/o reproductives més baixes que la progènie dels encreuaments entre individus del mateix llinatge. Aquest fenomen pot ocórrer de diferents maneres; en primer lloc, els genotips intermedis obtinguts del creuament podrien ser desfavorits o perdre adaptabilitat en un determinat ambient on sigui més avantatjós algun dels genotips dels llinatges originals. En segon lloc, podria donar-se la ruptura de compatibilitats bioquímiques o fisiològiques entre gens de les diferents poblacions. Un tercer efecte de l'OD és la pèrdua de l'especiació al·lopàtrica d'una població aïllada particular; en molts casos, l'especiació al·lopàtrica ajuda a mantenir la diversitat genètica de l'espècie ja que contribueix a la particularitat de les poblacions retenint trets exclusius de cada població. Per tant, tenint en compte els efectes d'una possible OD, el creuament entre llinatges divergents només s'hauria de contemplar en aquells casos en els que s'hagi demostrat clarament greus efectes per ID i, sempre que es pugui, havent testat els efectes de la hibridació durant al menys dues generacions (Edmands 2007).

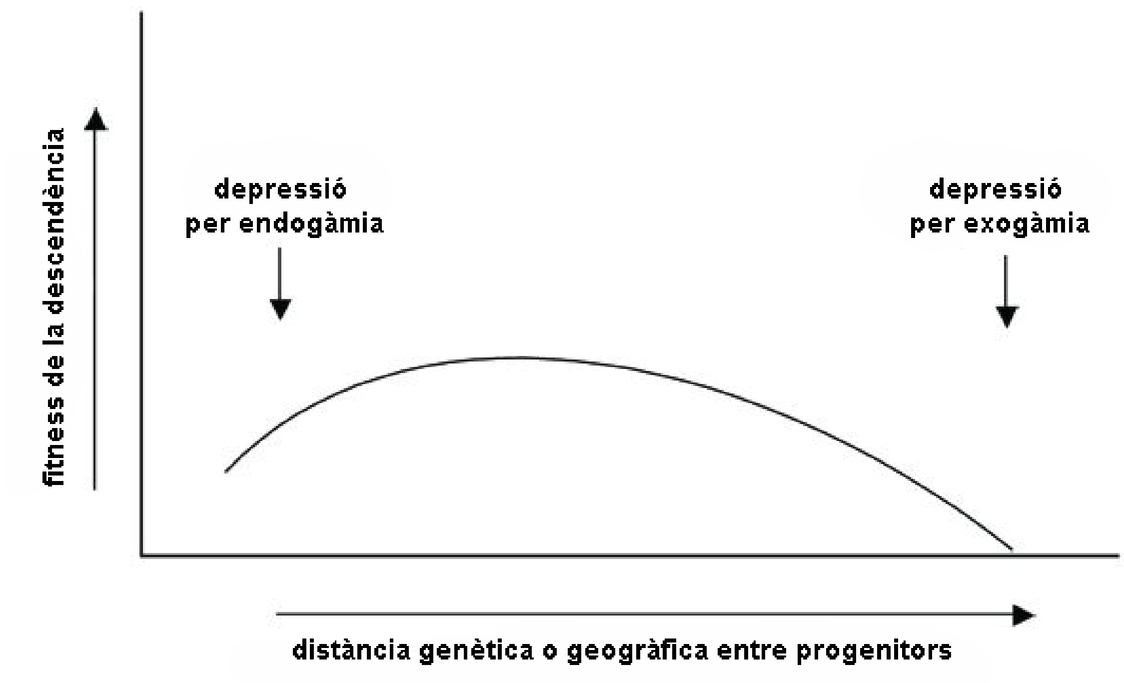


Figura 6. Zones de depressió per endogàmia i per exogàmia en funció de la distància entre progenitors. L'aparellament entre parents molt pròxims por comportar depressió per endogàmia, mentre que la descendència de parents genèticament molt diferents (o organismes de poblacions divergents) poden patir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

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

Els marcadors moleculars

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

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

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

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

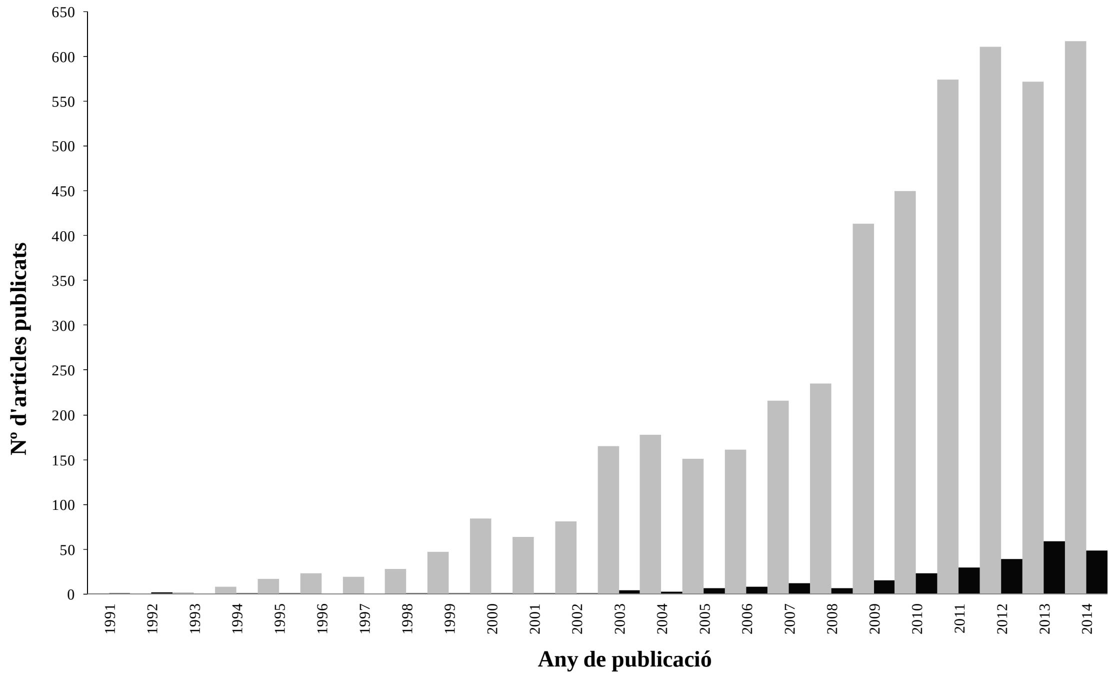


Figura 7. Nombre de publicacions per any des del 1991 fins al 2014 segons l'ISI Web of Knowledge. Els criteris de búsqueda han estat "*microsatellite*" i "*conservation*" (barres grises) i "*single nucleotide polymorphism*" i "*conservation*" (barres negres), tot filtrant els resultats per l'àrea de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

El coneixement de les seqüències d'ADN ha esdevingut indispensable per a la recerca biològica bàsica i per a nombrosos camps aplicats com és el cas de la genètica de la conservació. L'estudi utilitzant la combinació de marcadors d'ADN nuclear de còpia única (ADNn) i d'ADN mitocondrial (ADNmt) ha demostrat ser efectiu per a realitzar estudis filogenètics. L'ADN nuclear és l'ADN diploide contingut dins el nucli de les cèl·lules dels organismes eucariotes, i codifica per la majoria del genoma en aquests organismes. Aquest presenta herència mendeliana, i incorpora doncs informació d'ambdós progenitors. Les regions codificants d'ADNn són molt conservades (evolucionen lentament), i per tant, són bons marcadors per a estudiar les relacions filogenètiques entre taxons. En funció del nivell taxonòmic a resoldre (per exemple, fílum, família, gènere) es seleccionaran regions codificants més o menys conservades; la SSU (*nuclear small subunit*) és més conservada que la LSU (*large subunit*), i serà doncs utilitzada per resoldre filogènies a nivell de fílums, classes o ordres. En canvi, la LSU, més gran i amb una taxa d'evolució més ràpida, serà més utilitzada per nivells categòrics inferiors, com famílies o gèneres. L'ADNmt evoluciona més ràpidament que l'ADNn de còpia única; per exemple, en primats superiors muta 10 vegades més ràpid (Brown et al. 1979). Aquesta ràpida evolució es deu, en part, a la baixa eficiència de reparació de l'ADN polimerassa mitocondrial, i a l'alta concentració de mutàgens resultants dels processos metabòlics de la mitocòndria (Li 1997). Aquests fets fan que l'ADNmt pugui ser molt variable en vertebrats, proporcionant una alta resolució en estudis filogeogràfics. Una de les característiques típiques del genoma mitocondrial és que aquest és d'herència materna, i per tant, no es recombina; per això, la inferència de les relacions evolutives obtingudes a partir d'aquest s'han interpretar com una filogènia matriarcal. Al tractar-se d'un genoma haploide, les diferents variants gèniques que poden presentar s'anomenen haplotips i no al·lels, a diferència del que passa amb l'ADNn. El fet que sigui haploide, però, farà que en resoldre la història evolutiva de poblacions, només se'n obtingui una visió parcial. Així doncs, per a estudis poblacionals, els marcadors d'ADNmt seran relativament limitats, i serà necessari incorporar dades nuclears de mutació ràpida, com són els microsatèl·lits (Godinho *et al.* 2008).

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

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

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

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

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

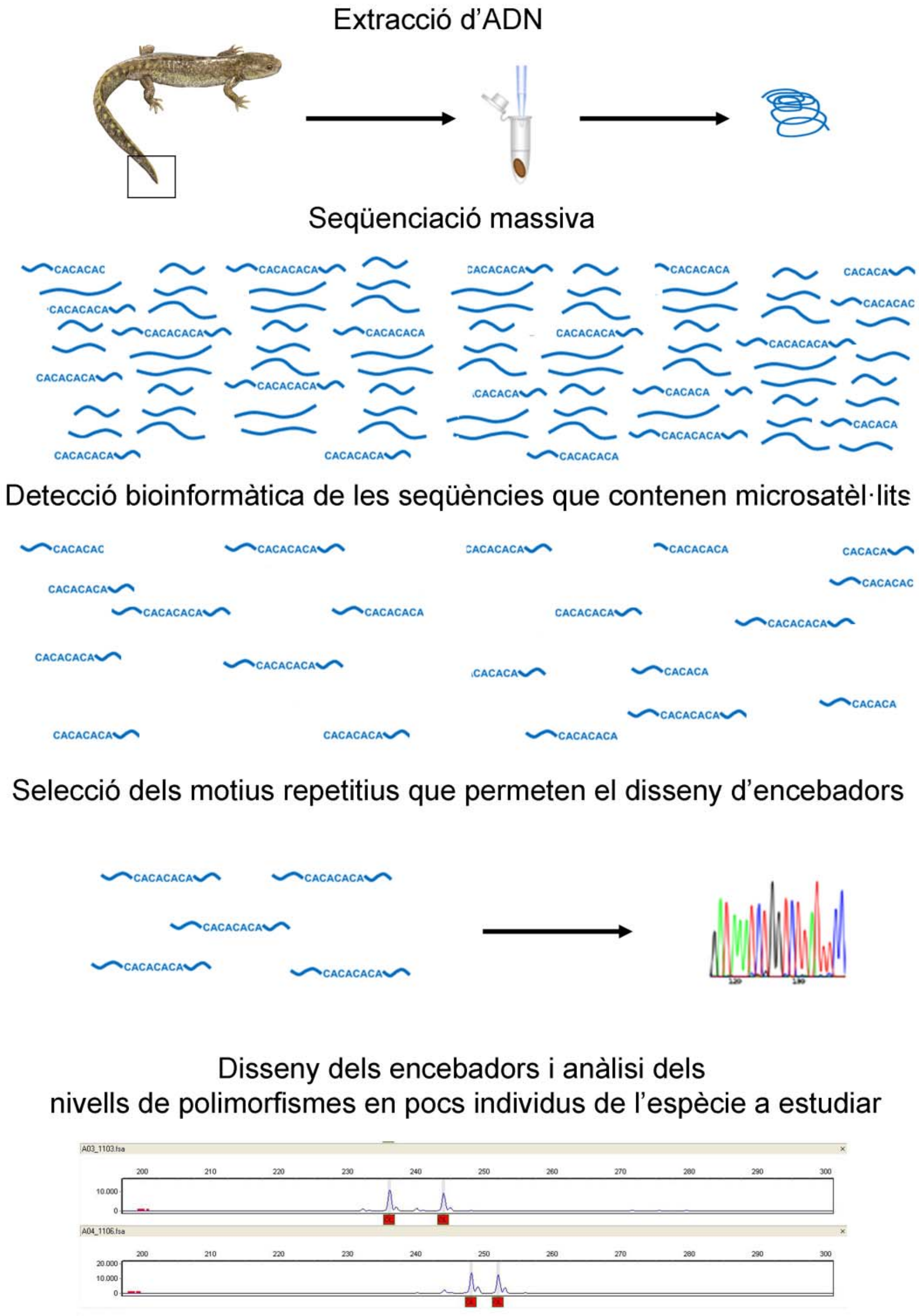


Figura 8. Metodologia utilitzant les NGS (*Next Generation Sequencing*) per al disseny de microsatèl·lits polimòrfics, utilitzant com a exemple el tritó del Montseny.

El nombre de marcadors moleculars recomanats variarà en funció del tipus de marcador i en funció de l'espècie a estudiar. Segons ConGRESS (*Conservation Genetic Resources for Effective Species Survival*; http://congressgenetics.eu; Hoban *et al.* 2013) el nombre de gens mitocondrials i/o nuclears de copia única utilitzats per a l'estudi de genètica de poblacions d'espècies rares o endèmiques varia entre 1-3. En el cas dels microsatèl·lits, el poder estadístic dels marcadors dependrà del grau de polimorfisme de cada *locus*. Generalment, si els marcadors presenten alts nivells de polimorfismes, es poden utilitzar un nombre relativament baix – menys de 20, i inclús menys de 10 (Wan *et al.* 2004). Tot i que els SNPs han crescut en popularitat molt recentment, el nombre de SNPs a utilitzar encara no ha estat avaluat; tot i així, alguns projectes de SNPs poden tenir centenars o inclús milers de marcadors. Així mateix, el nombre d'individus a analitzar és també un factor decisiu per a una correcta avaluació. En espècies amb mides poblacionals petites o de difícil accés, el nombre ideal d'individus mostrejat per població a nivell teòric és de 20-50 aproximadament segons ConGRESS.

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

3. EL GÈNERE *CALOTRITON*

Actualment, la família Salamandridae és un dels grups més diversos d'urodels amb 21 gèneres i més de 100 espècies reconegudes (AmphibiaWeb 2015) amb una àmplia distribució que s'estén per Europa, el nord d'Àfrica, Àsia i Amèrica del Nord. Tradicionalment, s'ha dividit en dos grans subgrups: "les veritables salamandres" (gèneres *Chioglossa*, *Lyciasalamandra*, *Mertensiella* i *Salamandra*) i els tritons (la resta de gèneres actuals) (Zhang *et al.* 2008). Dins d'aquests últims hi ha una tendència evolutiva constituïda per tritons que habiten medis aquàtics d'aigües corrents, fredes i oxigenades, els tritons de muntanya. Fins a la publicació de Carranza i Amat (2005), els tritons de muntanya europeus es consideraven dins del gènere *Euproctus* Gène, 1839. Aquest incloïa tres espècies, una a la Península Ibèrica (*E. asper*) i dues a les Illes Tirrèniques (*E. montanus* a Còrsega i *E. platycephalus* a Sardenya). Fins aleshores, tot i les similituds morfològiques entre aquestes tres espècies i un escenari biogeogràfic àmpliament acceptat, l'estat monofilètic d'aquest gènere havia estat qüestionat diverses vegades a nivell morfològic (Boulenger 1917; Despax 1923) i genètic (Gasser 1975; Steinfartz *et al.* 2002). Carranza i Amat (2005) utilitzant tres gens mitocondrials (Cyt *b*, 12S i 16S) van demostrar que *Euproctus* era, en realitat, un gènere polifilètic, ja que el tritó de muntanya del Pirineu estava més a prop filogenèticament als tritons del gènere *Triturus* que de la resta de les espècies del gènere *Euproctus*. Així, van separar els tritons de muntanya europeus en dos gèneres diferents, *Euproctus* per a les dues espècies de tritons tirrènics i *Calotriton* Gray, 1858 per als tritons de muntanya ibèrics (Figura 9).

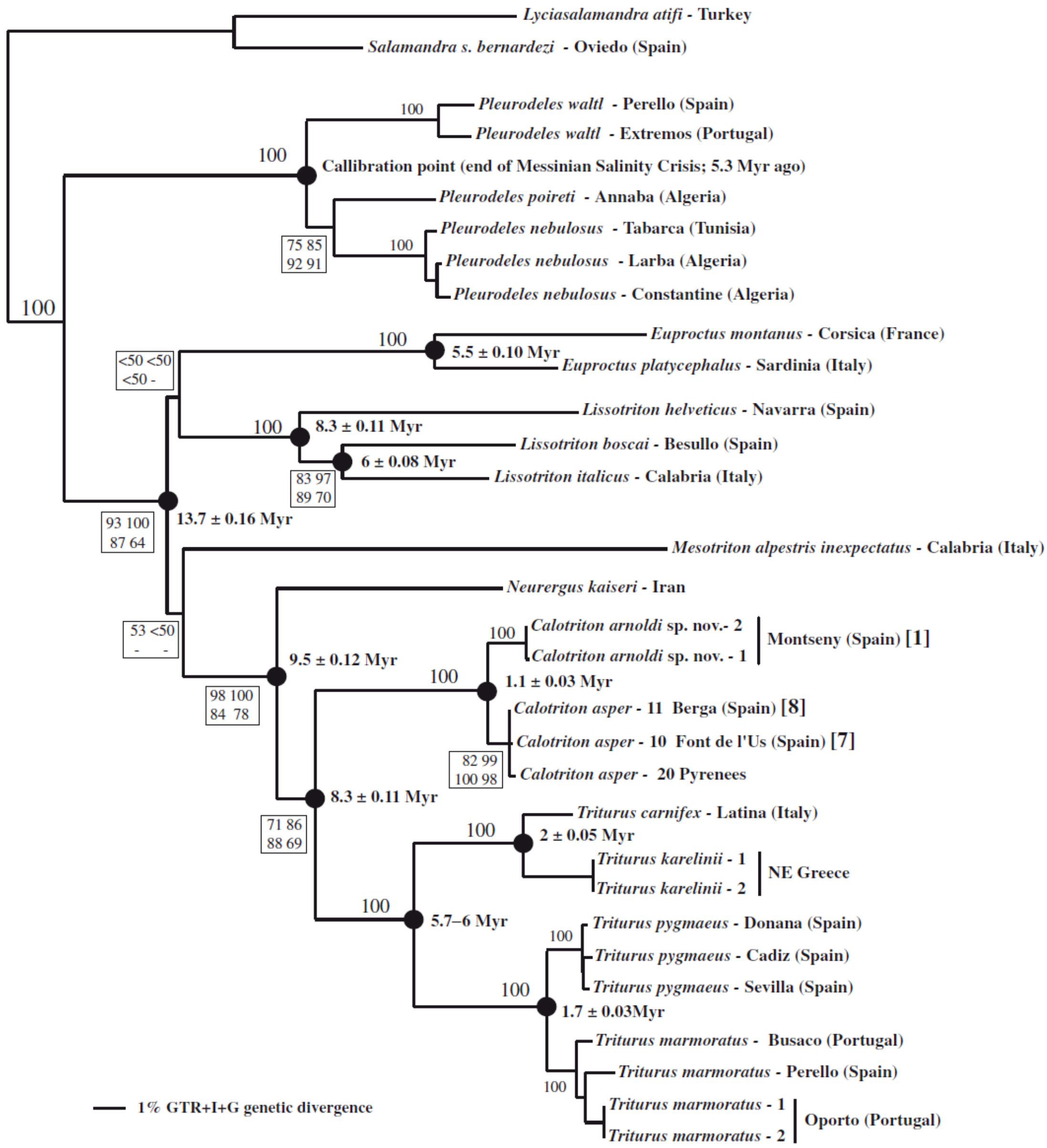


Figura 9. Arbre filogenètic segons la màxima versemblança (Maximum likelihood, ML) per alguns representants de la família Salamandridae segons Carranza i Amat (2005), combinant seqüències de tres gens mitocontrials, Cyt b, 16S i 12S.

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

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

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

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

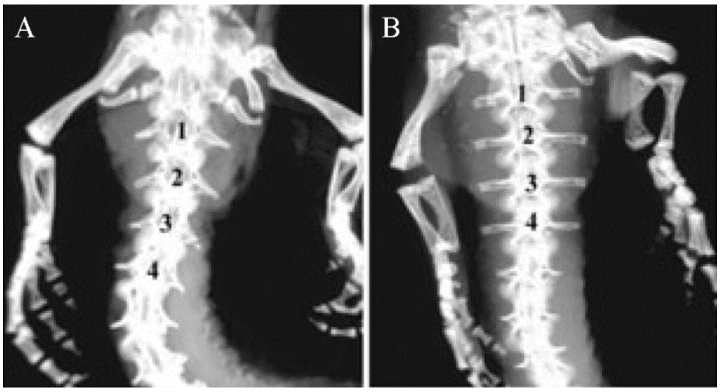


Figura 10. Diferències osteològiques de les apòfisis de les quatre primeres vèrtebres caudosacrals entre *Calotriton arnoldi* (A) i *C. asper* (B) segons Carranza i Amat (2005).

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

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

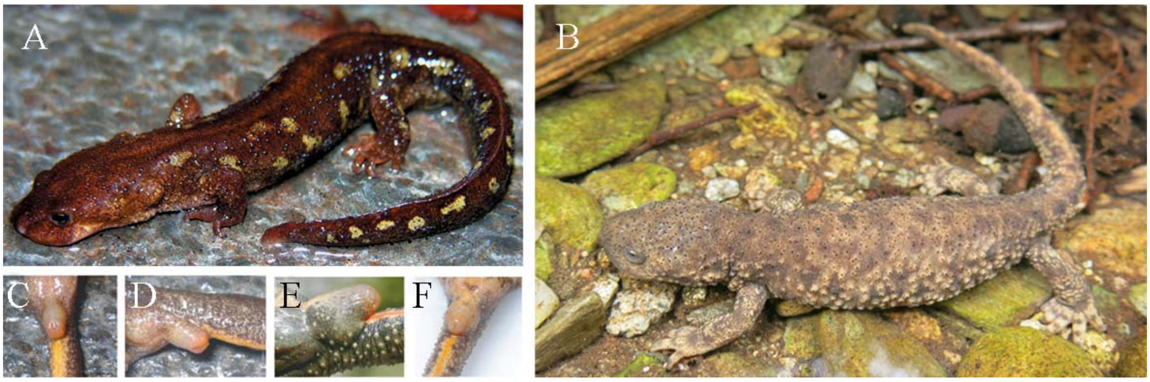


Figura 11. Diferències entre la granulositat i pigmentació de la pell entre *Calotriton arnoldi* (A) i *C. asper* (B), i detalls de la morfologia cloacal de *C. arnoldi* (C i D) i *C. asper* (E i F). Fonts: A, Valbuena-Ureña *et al.* (2013); C-F, Carranza i Amat (2005).

4. L'ESPÈCIE ESTUDIADA, *CALOTRITON ARNOLDI*

Identificació i descripció de l'espècie

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

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

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

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

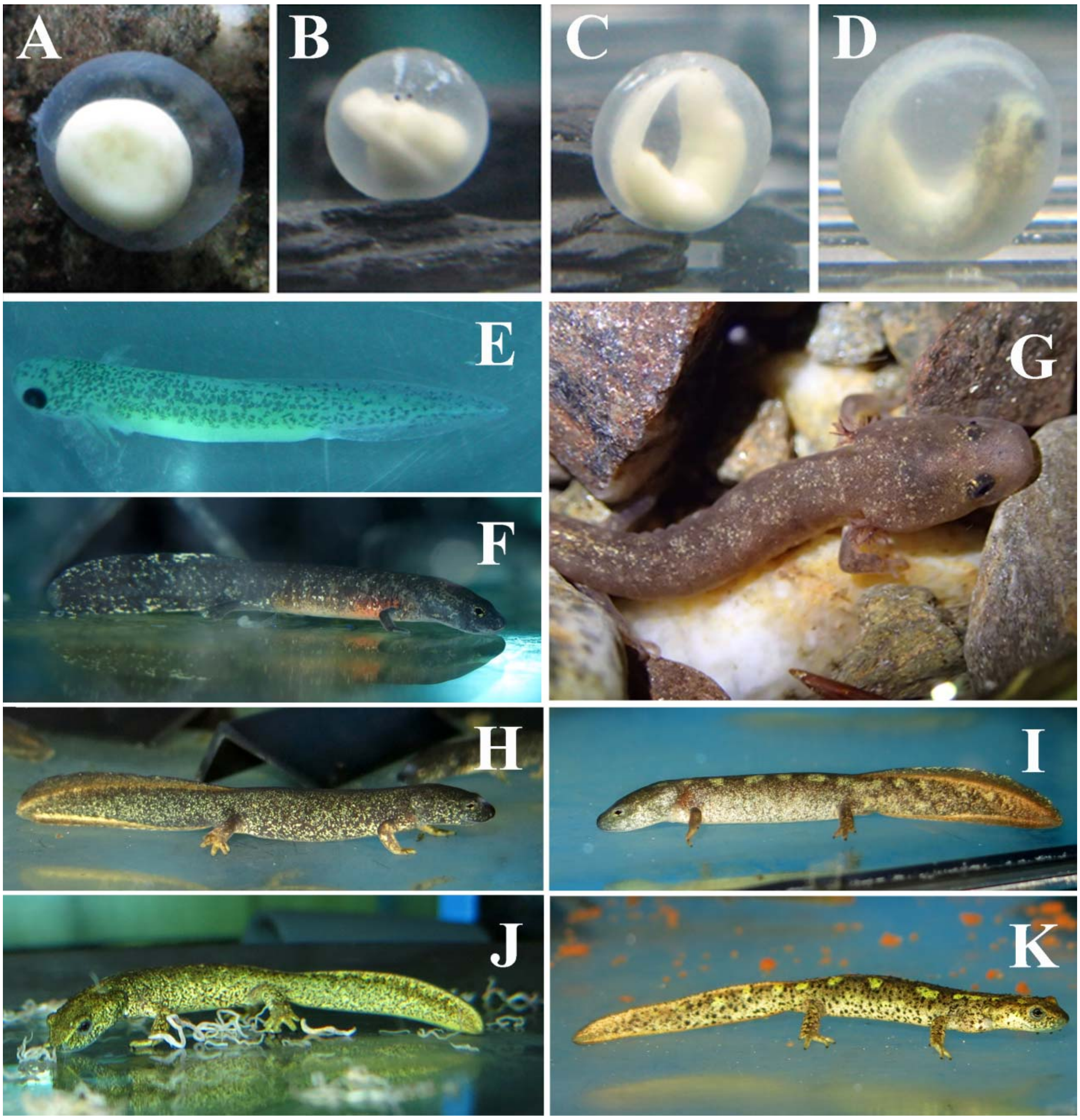


Figura 13. Detall de diferents estats de desenvolupament, des d'ou fins a juvenil (post-metamòrfic), de *Calotriton arnoldi*. Ous en diferents estats de desenvolupament (A-D), larva acabada d'eclosionar (E), larva de menys d'un any (F), detall de la part anterior d'una larva de menys d'un any (G), larves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

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

Distribució i hàbitat

Espècie endèmica del massís del Montseny, al nord-est de la Península Ibèrica. Les poblacions més properes de tritó pirinenc es troben a uns 25 km de distància, a la vessant sud del pantà de Susqueda (Baucells *et al.* 1998). Actualment el seu rang de distribució s'estima aproximadament en 8 km^2, restringit a uns pocs torrents de la conca de la Tordera. L'extensió lineal total de distribució de l'espècie (calculat al llarg dels diferents torrents) és de menys de 5,8 quilòmetres en el 2008 (Amat i Carranza 2009). S'han descrit un total de set torrents ocupats, distribuïts en dos sectors poblacionals situats a ambdós costats de la vall del riu Tordera. Aquests dos sectors estan separats per menys de 5 kilòmetres de distància en línia recta, i per prop de 40 km seguint la conca hidrogràfica. El sector oriental és el primer que es va descriure per Montori i Pascual (1981) i inclou 3 torrents. El sector occidental, descrit recentment per Amat (2004) comprèn 4 torrents. D'acord amb Montori i Pascual (1981) i Carranza i Amat (2005), i amb la finalitat de no divulgar la ubicació dels torrents per raons de conservació, ens referim als torrents orientals com A1, A2 i A3, i als quatre torrents occidentals com B1, B2, B3 i B4 (Figura 14). L'espècie ha desaparegut d'un tram d'una de les primeres localitats on es va descobrir (A2), segurament com a conseqüència de la forta sequera que pateix aquest tram de torrent. Durant els últims anys, s'està treballant per establir noves localitats fruit dels treballs de recuperació de l'espècie (Amat *et al.* 2014; Carbonell *et al.* 2014a).

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

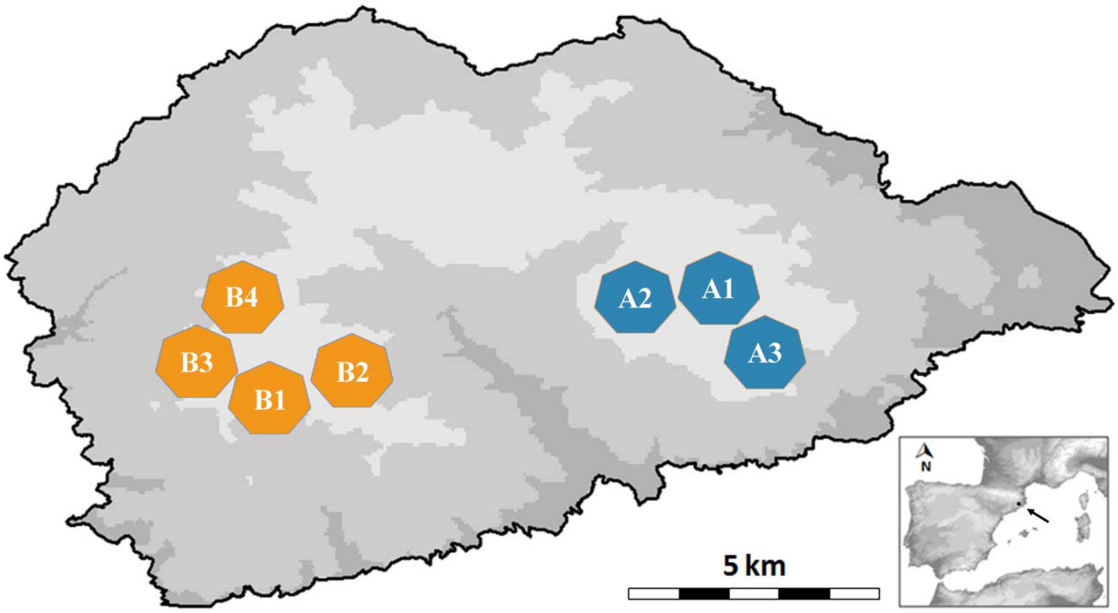


Figura 14. Distribució de les poblacions de *Calotriton arnoldi*. Localitats del sector oriental de la vall del riu Tordera (A1-A3) i localitats del sector occidental (B1-B4).

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

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

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

Ecologia i comportament

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

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

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

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

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

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

Factors d'amenaça

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

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

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

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

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

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

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

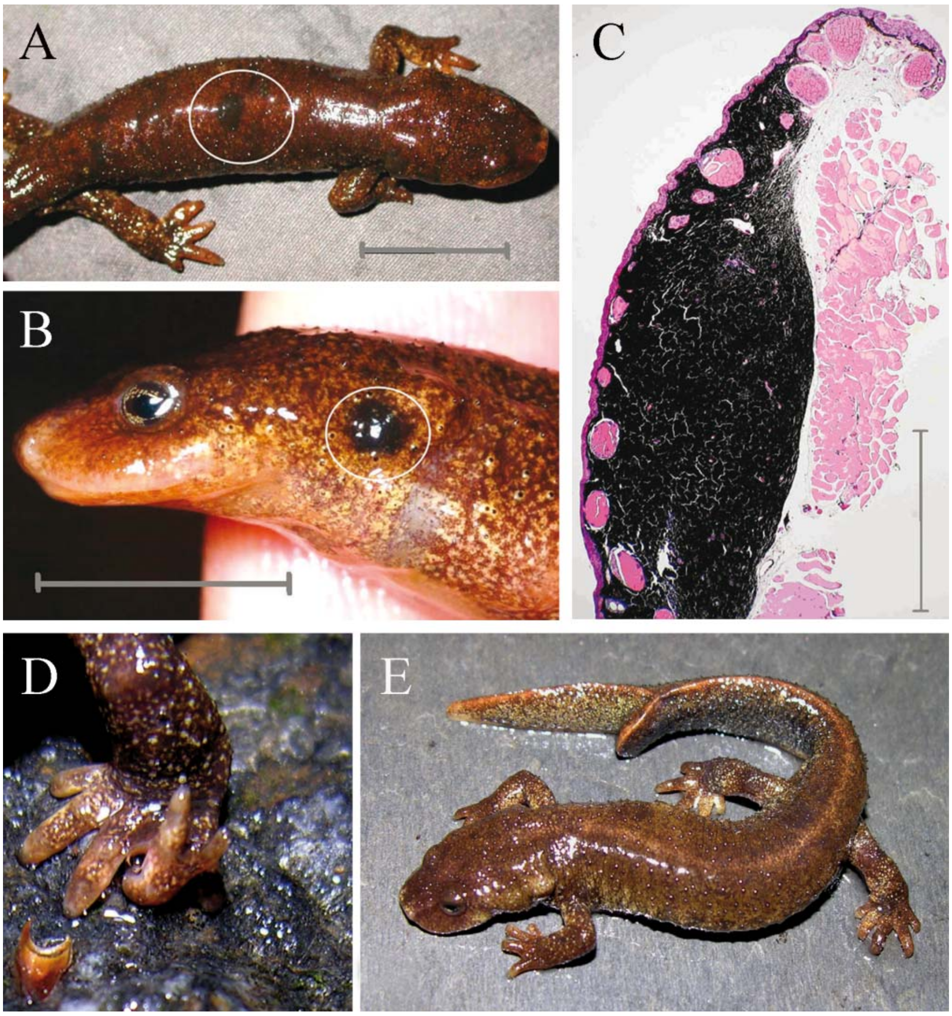


Figura 17. Fotografies de *Calotriton arnoldi* mostrant la presència de melanomes (A i B, bar = 1 cm), i secció histològica d'un melanoma (C) tenyida amb hematoxilina-eosina (bar = 1 mm); detall d'una extremitat d'un individu amb polidactília (D), i detall d'un individu amb cua bífida (E). Fonts: A-C,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

Conservació de l'espècie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E. O. Wilson

III. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

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

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

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

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

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

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

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

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

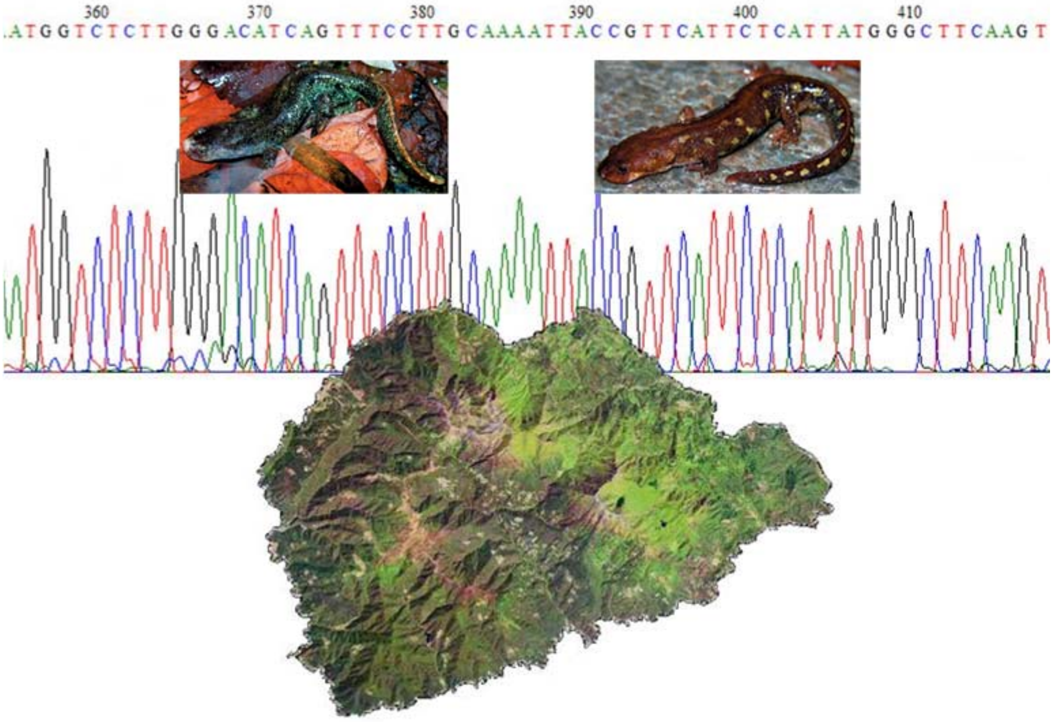
El tercer estudi (Capítol VI) és un dels treballs principals de la tesi, i es centra en la caracterització i estructuració genètica de les poblacions del tritó del Montseny, mitjançant l'anàlisi de 24 microsatèl·lits (els 15 anteriorment dissenyats més 9 cross-amplificats de *C. asper*). En aquest treball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

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

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

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

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



CAPÍTOL IV

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

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

Emilio Valbuena-Ureña[1,2]*, Fèlix Amat[3], Salvador Carranza[4]

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

Introduction

The evolutionary history of species strongly depends on the variation of their distributions throughout time and space. For instance, it is well known that during the Pleistocene many species shifted their distribution ranges as a result of the climatic cycles ([1] and references herein). The Quaternary age includes the last 2.6 My encompassing the Pleistocene and Holocene periods to the present. The Holocene is characterized for its relative climatic stability compared to the Pleistocene. The latter is notable for its strong oscillations in the climate with subsequent glacial and interglacial periods that have had a great impact on the distribution and evolution of species [2]. The effect of the ice ages on European species has been extensively studied ([3] and references herein). The fluctuating environmental conditions found during the recurrent ice ages, forced populations to migratory processes of contraction and expansion of their geographic ranges. During cold periods, the mountainous parts of southern Europe are likely to have provided suitable habitats for the species to survive acting as glacial refugia [4]. Further expansion from refugia occurred when the temperature increased. These successive colonization processes implied bottlenecks that may facilitate allopatric speciation in refugia [5], [6], [7]. Genetic divergence among populations may occur during periods of isolation, while dispersion processes and gene flow may take place during connectivity periods [4], [8], [9], [10]. Therefore, the actual distribution and genetic characteristics of species have been influenced by their past population history trends [11], [12].

Amphibians are good models to explore the influence of historical aspects on the genetic structure at different geographic scales ([13], [14], [15], [16], among others). This can be explained by the retention of strong phylogeographic signal due to the low dispersal capacity [17], and sensibility to small environmental changes [6]. Population differentiation related to the Pleistocene glaciations has been postulated among alpine urodeles [18], [19], [20]. Species distribution models (SDM) are useful for inferring climate-based potential distributions throughout the recent geological history and testing the existence of environmental barriers that could affect gene flow between closely related species [7], [21]. Thus, the combination of SDM and phylogeographic analyses is a good strategy to correctly interpret the actual genetic and geographic structure of species.

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

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

Materials and Methods

Ethics Statement

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

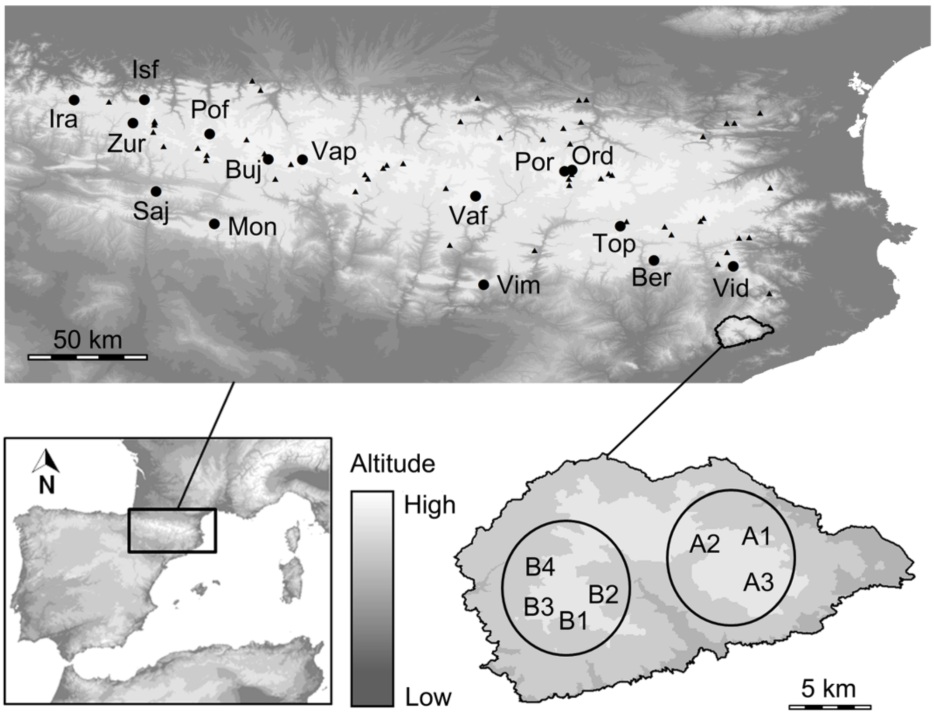


Figure 1. The study area in the NE Iberian Peninsula showing the distribution of the genus *Calotriton*. Circles indicate populations of *C. asper* included in the molecular analyses; triangles correspond to additional populations included in the species distribution modeling (SDM). All localities of *C. arnoldi* are included in the molecular analyses. Locality codes correspond to names on Table 1. Localities of *C. arnoldi* represented do not correspond to the exact geographic locations intentionally due to conservation reasons.
doi:10.1371/journal.pone.0062542.g001

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

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

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

doi:10.1371/journal.pone.0062542.t001

permission number 2012/721 for *C. asper*; Instituto Aragonés de Gestión Ambiental, Area II-Biodiversidad of Aragon Government, with the permission numbers 24/2010/901 and 24/2012/661 for *C. asper*. Tissue samples were collected according to the requirements of the above administrative institutions: newts were captured manually and tissue samples from tail tips and morphological measurements were taken without the use of anesthetics to avoid accidental mortality. Immediately after the

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

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

doi:10.1371/journal.pone.0062542.t002

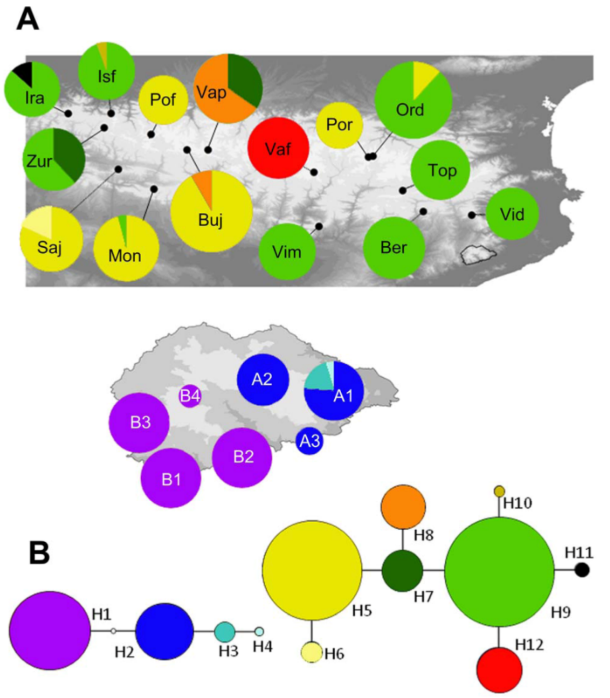


Figure 2. Map showing the geographical distribution of Cyt *b* DNA haplotypes. (A) Pie diagram size indicates number of individuals. (B) Statistical parsimony networks showing cytochrome *b* haplotypes found for *Calotriton arnoldi* (left) and *C. asper* (right); circle size are proportional to haplotype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

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

Field sampling and DNA sequencing

A total of 420 individuals were analyzed for the cytochrome *b* gene, of which 315 correspond to *C. asper* from 15 different localities covering most of its distribution range and 105 to *C. arnoldi*, including samples from the complete distribution range of the species (seven populations). For the RAG-1 gene 33 and 75 specimens were analyzed, respectively. The number of individuals collected at each site and sampling locations are reported on Table 1. In order to preserve the critically endangered populations of *C. arnoldi* the three eastern populations are herein refereed as A1, A2, A3, and the four western populations as B1, B2, B3 and B4. Tissue samples consisted of tail tips or fingers preserved in absolute ethanol until further analysis. Genomic DNA was extracted using Qiagen^{TM} (Valencia, California) DNeasy Blood and Tissue Kit following the manufacturer's protocol. A region of 374 bp of the cyt *b* gene was amplified using primers Cytb1EuprF and Cytb2EuprR [20] and using the same PCR conditions as in Carranza *et al.* [29]. Additionally, the following primers were designed to sequence a fragment of 530 bp of the RAG-1 gene: CaloRAG1-831F 5′-CGGTACGAGATCTGGCGGTCC-3′ and CaloRAG1-1362R 5′-TATCTCAGGCACGTGGGCTAGT-3′; the PCR program used for this region included an initial denaturing step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 45 s, extension at 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 5 min. Sequences were aligned using BioEdit 7.0.1 [30] and variable sites were checked visually for accuracy. Coding gene sequences were translated into amino acids using the vertebrate mitochondrial code and standard code, and no stop codons were observed, suggesting that they were probably all functional. Direct sequencing of PCR products for RAG-1 revealed a single nucleotide site at which individuals were heterozygous. Diploid amplified sequences were represented by two alleles [16], [31].

Molecular data analyses

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

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

Species distribution modelling

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

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

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

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

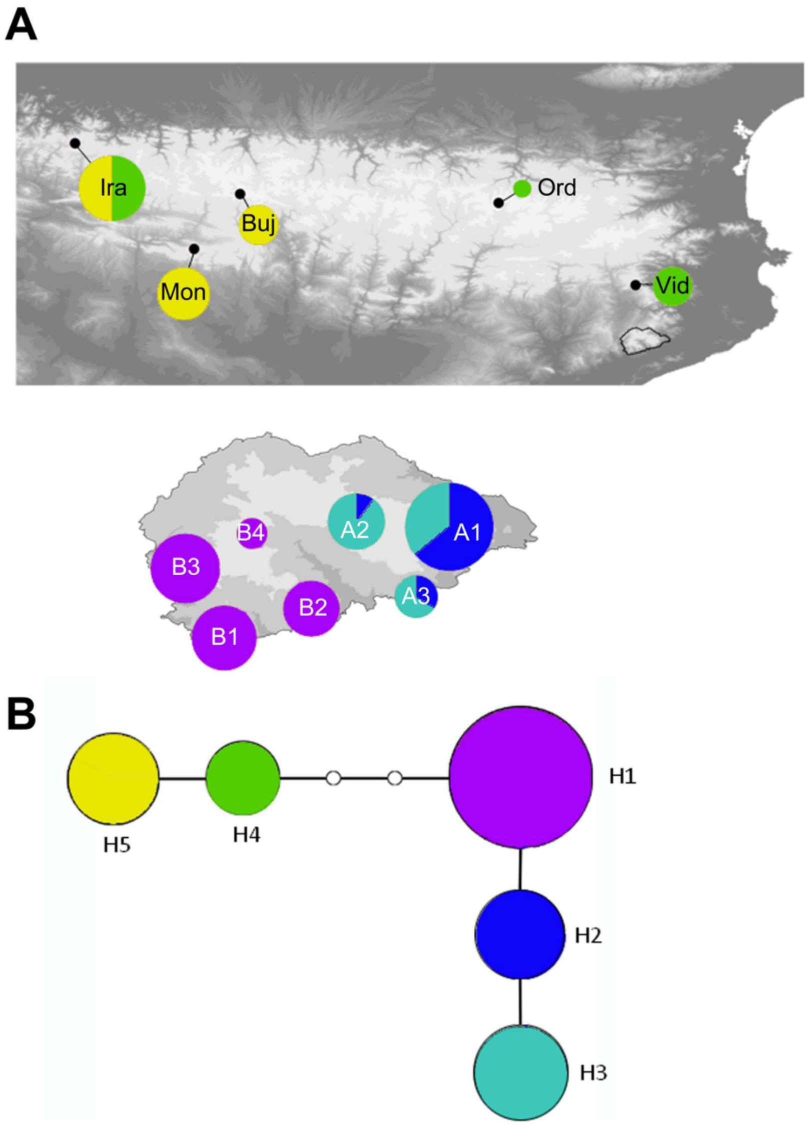


Figure 3. Map showing the geographical distribution of RAG-1 DNA haplotypes. (A) Pie diagram size indicates number of individuals. (B) Statistical parsimony network showing nuclear haplotypes found for *Calotriton* genus; circle sizes are proportional to haplotype abundance, straight lines and black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

classes (North, East, South and West) using the same program. Landcover was downloaded from the Global Environment Monitoring database (bioval.jrc.ec.europa.eu). To account for geological range constraints, we additionally used lithology (dominant parent material) derived from the European Soil Database v. 2 [43] as a categorical predictor variable, encompassing 43 categories of geological material in the Iberian Peninsula. Because the geology is unlikely to have changed significantly since the LGM, we treated the lithology as constant [44]. SDM were generated following the maximum entropy modelling implemented in Maxent 3.3.3e [45]. This algorithm has been proven to produce high quality predictions using environmental parameters in combination with geographical presence-data of species , [15], [46], [47]. Geographical occurrences were partitioned between training and test samples (75% and 25%, respectively), as this has been proven to provide high predictive accuracy [48]. The fade-by-clamping option was used in Maxent to remove heavily clamped pixels from the final models. As ensemble model predictions may enhance the reliability and robustness of SDM results [49], a hundred models with randomly selected test samples were computed. The average output probability of presence of the species was set to logistic format. The model performance was evaluated using the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristics (ROC) curve plots, which plot the true-positive rate against the false-positive rate. Models with AUC values above 0.75 are considered useful [46], [50], [51]. The model was evaluated using a null model procedure [52]. We generated 999 sets of 69 random occurrence points (equal to the number of real occurrence points in our dataset) using ENMTools Version 1.3 [53]. We used Maxent to calculate AUC for each of the 999 null datasets and tested whether the AUC of the *C. asper* dataset exceeded the 95th percentile of the

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

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

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

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

Morphometric analysis

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

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

Results

Analyses of genetic structure

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

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

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

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

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

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

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

*P<0.05, ** P<0.0001

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

doi:10.1371/journal.pone.0062542.t005

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

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

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

Species distribution modelling

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

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

Morphological data

MANOVA analysis found sexual (Wilk's Lambda $_{8\ 152}$ = 0.143; P<0.0001) and population (Wilk's Lambda $_{8\ 152}$ = 0.576; P<0.0001) significant differences without interaction between these two factors (Wilk's Lambda $_{8\ 152}$ = 0.907; P = 0.058). A posthoc test for unequal size showed no significant differences among sexes or populations in SVL and LI while HL and TH were the only sexually discriminant variables (Table 6). The length of the two limbs, HW (with the only exception of the comparison between western and eastern females) and TL (with the only exception of the comparison between western females and eastern males) indicated population and sexual differences. The Discriminant analysis showed sexual separation based on the first canonic root (Figure 5): males have short and high tails, in comparison with females. Population differences were less marked and exclusively defined by the second canonic root. Males and females from eastern populations have longer limbs than western ones, while males from western populations have wider heads and longer tails than eastern ones.

Our analyses of coloration found striking differences between sectors defined by two traits: dorsal yellow spots and whitish margin of the snout (Figure 6). The first trait was never found in western populations (Chi-square test X^2_1 = 106.312, P<0.001) and therefore is exclusive of the eastern populations. The coloration of the margin of snout is a new diagnostic character that is always

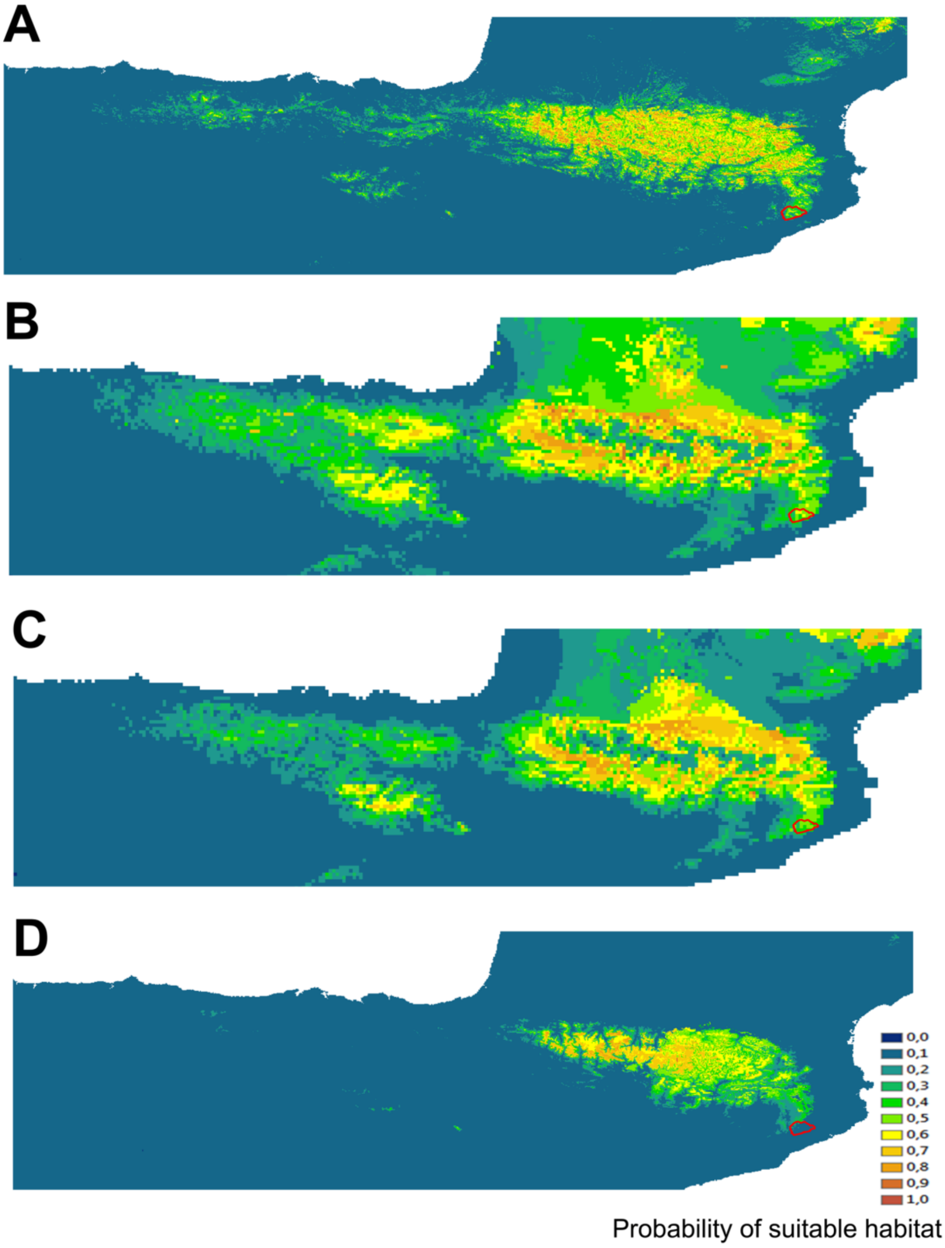


Figure 4. Predicted distribution models of *Calotriton asper*. (A) Present distribution using climate and topographic variables, landcover and lithology. Last Glacial Maximum based on (B) CCSM model and (C) MIROC model, and (D) Last Interglacial distributions using climate variables and lithology. Warmer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

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

Discussion

Evolutionary history of the genus *Calotriton*

Our study indicates that there is an unexpectedly high level of lineage sorting between the two *Calotriton* species and within *C. arnoldi*, both with nuclear and mitochondrial genes. Despite being phylogenetically very closely related [20], the network analysis of the nuclear gene fragment RAG-1 (Figure 3) shows that all 66 alleles of *C. asper* and all 150 alleles of *C. arnoldi* analyzed in the present study are unique for each species. Moreover, the analysis of all 315 mtDNA sequences of the cyt *b* gene of *C. asper* and all 105 sequences of *C. arnoldi* resulted in two independent networks with all sequences being unique for each species (Figure 2). These results indicate that, despite their geographic proximity and morphological similarity, there is no evidence of gene flow between these two species, i.e. there is no signal of genetic introgression between them. This is especially relevant taking into account the short geography distance between the closest populations of each species (less than 25 km), the overall habitat similarity and the same courtship behavior based on female caudal

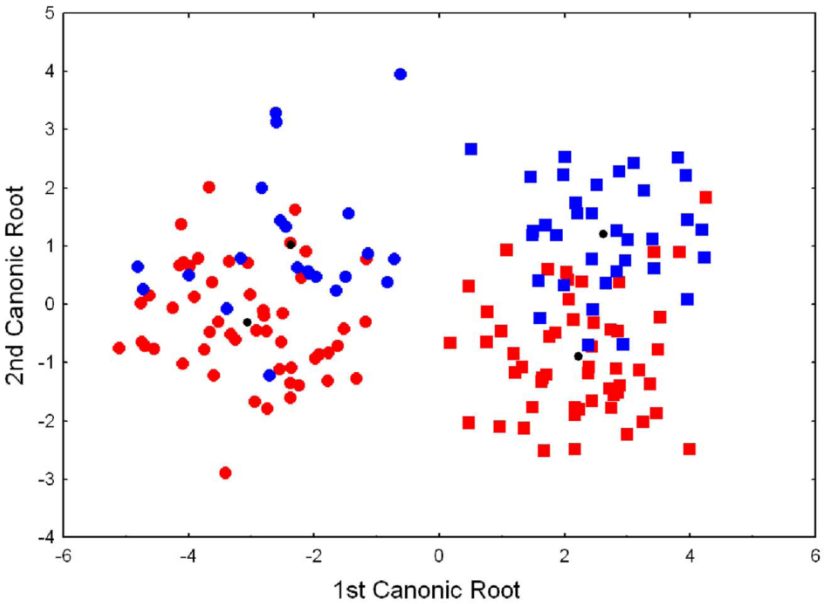


Figure 5. Discriminant canonical analysis scatterplot of males and females of *Calotriton arnoldi* from eastern and western sectors. Red squares and circles indicate eastern males and females, and blue squares and circles show western males and females, respectively. Black points are the mean values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

capture [54]. Strong intraspecific genetic structuring and interspecific divergence is found in other salamanders including situations of sympatry, allopatry and parapatry in small mountain ranges with limited or complete absence of gene flow (see for example the salamanders of the *Plethodon ouachitae* complex [12], [55], [56]). The differences in the degree of genetic differentiation found between RAG-1 and cyt *b* are not surprising, especially if one takes into account that population history produces less phylogeographic signal with nuclear than with mitochondrial DNA data owing to their established divergence rates [15], [57], [58]. The results of the AMOVA confirm this noteworthy specific differentiation being statistically significant for both markers and, as above, more notable in the mitochondrial than in the nuclear data (with variances among species of over 90% and near 80%, respectively) (Table 4). This differentiation suggests that *Calotriton* species have not been in contact for a long time. These results are in accordance with the speciation time determined for these species [20], which occurred during the Pleistocene, around 1.1–2 Mya.

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

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

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

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

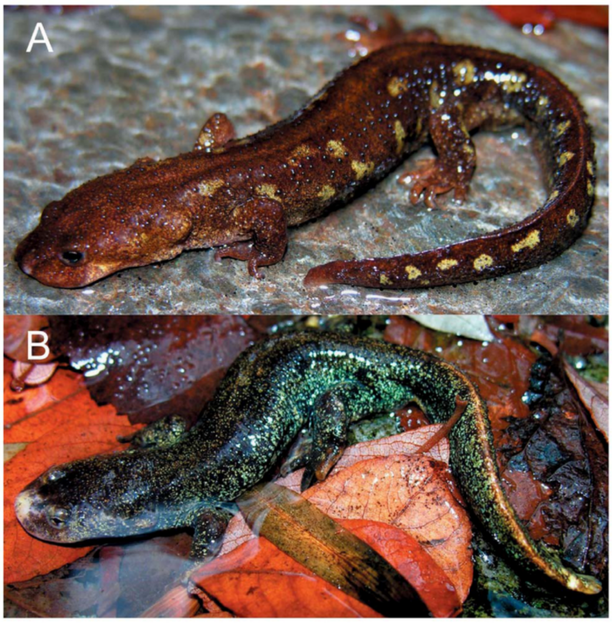


Figure 6. Characteristic patterns of coloration of newts belonging to the two sectors of *Calotriton arnoldi* range. (A) Adult female from the eastern populations showing yellow spots found in 78.8% of the individuals, and (B) adult male from the western populations with the whitish margin of the snout.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

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

Regarding the SDM results and some fossil records from Cova Colomera (Montsec, Lleida) [60], it is suggested that *C. asper* has survived across the Pyrenean axial mountains, avoiding the highest altitudes during periods of sharp glacial climatic conditions (LGM). Paleoclimatic studies have detected periglacial events during the last glaciations [61], indicating alpine condition in the ridges of the Montseny separating the south (the Tordera Valley where *C. arnoldi* is distributed), from the north face of the massif. It is possible that these harsh environmental conditions could have prevented the expansion of the Pyrenean species to the Montseny during the LGM period. Climatic conditions during LI were in many aspects similar to current ones in the Western Mediterranean basin ([62] and references therein), thus it is not surprising the similarity found between LI and present SDM maps. The fact that *C. asper* can be found at high altitude [20] may explain that during warmer periods (LI and present) the species disappeared from lower altitudes. During the warmer periods, the distribution of this species has been confined to the Pyrenean and pre-Pyrenean mountains [63] (Figure 4). Although the Pyrenean newt is a highly polymorphic species [63], [64], [65], [66], the genetic results (only 8 and 2 haplotypes found for cyt *b* and RAG-1, respectively across more than 20000 km^2) suggest that this widespread species presents a low level of genetic variability in the two genes analyzed here compared to its congener, the Montseny brook newt, which presents an extremely small distribution range (20 Km^2). Morphological differences may appear under local selection pressure in response to population specific ecological conditions [66]. These results indicate that not enough time has passed yet to find these phenotypic differences fixed into the genotype of the morphologically different populations of *C. asper*. The low genetic variability of *C. asper* may be explained by the much broader climatic suitability shown during the LGM that could allow the connection of populations and subsequent homogenization as a consequence of gene flow [46] and the subsequent recent re-colonization of the highest altitudes not long ago after the last glacial maximum [20], [67]. A similar pattern of low level of genetic variability is found in *Rana pyrenaica* [67], a species that shares geographical distribution and potential niche (mountain streams) with *C. asper*. Even though, owing to the discrepancies of high levels of variability found with AFLPs markers [39], further studies using faster markers like microsatellites are required to better understand its population structure.

Population structure within *Calotriton arnoldi*

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

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

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

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

Implications for the conservation of *C. arnoldi*

One of the major objectives of any conservation plan is the maintenance of genetic variability [71]. The results obtained in this study will certainly be helpful for the conservation program of the Montseny brook newt. Habitat disturbance including large amounts of water extracted for commercial purposes, deforestation and the existence of tracks and roads that disrupt the brook continuity, are all major threats affecting this species [25], [26], [72] similarly to other isolated glacial amphibian relicts [73]. As a result, the Montseny is changing and drying out at a considerable pace and the distribution of *C. arnoldi* is being reduced dramatically [27]. The low population size of the species together with its reduced and disturbed distribution area requires urgent management guidelines for the long-term survival of this species.

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

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

Acknowledgments

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

Author Contributions

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

References

1. Schmitt T (2007) Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. Frontiers in Zoology 4: 11.
2. Lowe JJ, Walker MJ (1997) Reconstructing quaternary environments: Longman London.
3. Hewitt G (2011) Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. Genetica 139: 617–638.
4. Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. Biological Journal of the Linnean Society 58: 247–276.
5. Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A-G, Cosson J-F (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Molecular Ecology 7: 453–464.
6. Wake DB (2006) Problems with species: patterns and processes of species formation in salamanders. Annals of the Missouri Botanical Garden 93: 8–23.
7. Kozak KH, Wiens J (2006) Does niche conservatism promote speciation? A case study in North American salamanders. Evolution 60: 2604–2621.
8. Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 359: 183–195.
9. Jansson R, Dynesius M (2002) The fate of clades in a world of recurrent climatic change: milankovitch oscillations and evolution. Annual Review of Ecology and Systematics 33: 741–777.
10. Wiens John J (2004) What Is Speciation and How Should We Study It? The American Naturalist 163: 914–923.
11. Avise JC (2000) Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge: Harvard University Press.
12. Shepard DB, Burbrink FT (2009) Phylogeographic and demographic effects of Pleistocene climatic fluctuations in a montane salamander, *Plethodon fourchensis*. Molecular Ecology 18: 2243–2262.
13. Zhang P, Papenfuss TJ, Wake MH, Qu L, Wake DB (2008) Phylogeny and biogeography of the family Salamandridae (Amphibia: Caudata) inferred from complete mitochondrial genomes. Molecular Phylogenetics and Evolution 49: 586–597.
14. Zeisset I, Beebee TJC (2008) Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. Heredity 101: 109–119.
15. Bisconti R, Canestrelli D, Colangelo P, Nascetti G (2011) Multiple lines of evidence for demographic and range expansion of a temperate species (*Hyla sarda*) during the last glaciation. Molecular Ecology 20: 5313–5327.
16. Mattoccia M, Marta S, Romano A, Sbordoni V (2011) Phylogeography of an Italian endemic salamander (genus *Salamandrina*): glacial refugia, postglacial expansions, and secondary contact. Biological Journal of the Linnean Society 104: 903–992.
17. Garcia-Porta J, Litvinchuk SN, Crochet PA, Romano A, Geniez PH, et al. (2012) Molecular phylogenetics and historical biogeography of the west-palearctic common toads (*Bufo bufo* species complex). Molecular Phylogenetics and Evolution 63: 113–130.
18. Steinfartz S, Veith M, Tautz D (2000) Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. Molecular Ecology 9: 397–410.
19. Riberon A, Miaud C, Grossenbacher K, Taberlet P (2001) Phylogeography of the Alpine salamander, *Salamandra atra* (Salamandridae) and the influence of the Pleistocene climatic oscillations on population divergence. Molecular Ecology 10: 2555–2560.
20. Carranza S, Amat F (2005) Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula. Zoological Journal of the Linnean Society 145: 555–582.
21. Sexton JP, McIntyre PJ, Angert AL, Rice KJ (2009) Evolution and Ecology of Species Range Limits. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 40: 415–436.
22. Bosch J, Tejedo M, Lecis R, Miaud C, Lizana M, et al. (2009) *Calotriton asper*. IUCN 2012: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1.

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

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

CAPÍTOL V

Conservation Genet Resour (2014) 6:263–265
DOI 10.1007/s12686-013-0082-7

TECHNICAL NOTE

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

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

Received: 12 October 2013 / Accepted: 23 October 2013 / Published online: 31 October 2013

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

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

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

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

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

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

The critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) is one of the most endangered amphibians in Europe (Carranza and Martínez-Solano 2009). The current global population size is estimated at less than 1,500 mature individuals, limited to an area of only 20 km^2 in the Montseny Mountains Natural Park, NE Iberian Peninsula. Their disconnected populations are found in seven closely located brooks, fragmented into two main sectors (eastern and western) on both sides of the Tordera river valley and separated by an unsuitable habitat. To date, one of the management measures for the conservation of this species is the development of a captive breeding program, which started in 2007 by the Catalonian Government. This breeding program maintained individuals from both sectors separately into two evolutionary significant units Previous genetic studies based on mitochondrial and nuclear sequence analysis suggested the isolation of eastern and western sectors confirming the need for the continuation of the maintenance of the two breeding stocks (Valbuena-Ureña et al. 2013). Furthermore, genetic studies applying high resolution genetic markers, such as microsatellite loci are needed to infer the degree of current gene flow among populations within sectors. The development of microsatellite markers in *C. arnoldi* should greatly enhance our understanding of this species in both an evolutionary and conservation oriented framework and should serve as an important tool for future studies aiming at: (1) assessing levels of genetic diversity and population structure; (2) checking the genetic connectivity between populations within sectors and the degree of isolation; (3) determining which units are of particular importance for maintaining species genetic diversity; and (4) addressing these results to the conservation strategies by studying the effect of the captive breeding program on the genetic diversity of the species. Here, we describe new primer pairs for the successful amplification of 15 unlinked polymorphic loci for this species.

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

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

Primer ID		Sequences 5′-3′	Repeat motif	Allele range (bp)	No. of alleles	H_O	H_E	P_{HW}
Calarn_02248	F:	CACAACAACAGGCGAATGAC	$(TATC)_{18}$	185–209	6	0.739	0.642	0.1161
	R:	ACTTTAGGTCTTGCGTTGGC						
Calarn_29994	F:	ACCAGCTGCACTCTGCTATC	$(TATC)_{8}$	169–173	2	0.087	0.162	0.1318
	R:	GTGCTGCTCATCAAATAGTCAAC						
Calarn_37825	F:	CATCCTTGTAGCAGGCCTTTG	$(AGAT)_{18}$	227–255	8	0.870	0.814	0.5412
	R:	CTACCAGGGGTTGATCTCAGG						
Calarn_14961	F:	TTGAGAAATGCAAGGTCGCC	$(TATC)_{11}$	201–221	4	0.609	0.649	0.2238
	R:	GTCAGGATGACGCGTTTCG						
Calarn_15906	F:	TCAATCAAGGGCAAGATGATGAC	$(CTAT)_{14}$	113–125	4	0.913	0.702	0.1373
	R:	ACCAATGACCTATCACAGCC						
Calarn_12022	F:	CTCTCACGGAAAAGCTCAGG	$(TCTA)_{14}$	224–248	5	0.391	0.430	0.0286
	R:	GCGTGGCCCAATACATATTCC						
Calarn_06881	F:	AGCGCATTGCTGCCTGTG	$(AGAT)_{15}$	162–174	4	0.391	0.490	0.1454
	R:	TACAGAGGGAGTGGGAGGAG						
Calarn_50748	F:	ATTGGGGTATATTGGGGCTC	$(AGAT)_{13}$	201–213	4	0.565	0.579	1.0000
	R:	GGCATCCATCACCGATTATCTATC						
Calarn_36791	F:	TTGGAGGTGTCATCAGTGGG	$(TCTA)_{18}$	128–148	5	0.826	0.729	0.8491
	R:	AACCACAGAAATTCACCAGTC						
	F:	GTAGGTTTGGTGCGAAGTGG	$(AGAT)_{15}$	224–236	4	0.478	0.410	1.0000
	R:	GTACGAGATCTTCTCAGTGGC						
Calarn_52354	F:	AAACTGTGGCATCTTGTGGC	$(ATCT)_{12}$	220–240	4	0.565	0.467	0.8995
	R:	AGACAGCATCTGTGTCCTCTG						
Calarn_30143	F:	AGGTTAGGTTTAGGTTTACTGCAC	$(TCTG)_{7}$	190–230	5	0.609	0.690	0.5285
	R:	AGCTTCGTCATTCTTGTACCC						
Calarn_31321	F:	GCTTACATCCATCCTTCTCGTC	$(ATCT)_{19}$	173–193	6	0.652	0.757	0.3864
	R:	AGGCAGATGTTTTGATGGGTG						
Calarn_15136	F:	GCTAGTTTGCTTTGGCAGTTC	$(TGTA)_{15}$	165–177	4	0.478	0.506	0.4615
	R:	CTGCCTTTTGGCTAGGTTCG						
Calarn_37884	F:	GGGGCGCAAGTTACAGTTAG	$(ATAG)_{10}$	248–267	5	1.000	0.710	0.0013*
	R:	ATGTAGTGTGGCAGGTGAGG						
M13		TGTAAAACGACGGCCAGT						

* P value < 0.01

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

The new fifteen polymorphic loci described here together with ten loci, which have been previously developed for *C. asper* and successfully cross-amplified in *C. arnoldi* (Drechsler et al. 2013) provide a powerful tool to challenge urgently needed conservation genetics studies in this critically endangered European amphibian. In turn, these new markers are also likely to be applicable for its closely related sister species, the Pyrenean brook newt *C. asper*.

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

References

Carranza S, Martínez-Solano I (2009) *Calotriton arnoldi*. IUCN red list of threatened species. Version 2012.1 Accessed 04 July 2012

Drechsler A, Geller D, Freund K, Schmeller DS, Künzel S, Rupp O, Loyau A, Denoël M, Valbuena-Ureña E, Steinfartz S (2013) What remains from a 454 run: estimation of success rates of microsatellite loci development in selected newt species (*Calotriton asper*, *Lissotriton helveticus*, and *Triturus cristatus*) and comparison with Illumina-based approaches. Ecol Evol 3(11):3947–3957. doi:10.1002/ece3.764

Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Mol Ecol Resour 8(1):103–106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nat biotechnol 18(2):233–234

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

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol EcolSS Notes 4(3):535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

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

CAPÍTOL VI

Advantage or burden – habitat fragmentation in a critically endangered amphibian species (*Calotriton arnoldi*) and its implications for species conservation

Valbuena-Ureña E[1,2], Soler-Membrives A[1], Steinfartz S[3], Carranza S[4]

[1]Unitat de Zoologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Catalonia, Spain;
[2]Centre de Fauna Salvatge de Torreferrussa (Catalan Wildlife Service – Forestal Catalana). Finca de Torreferrusa, Crta B-140, Km 4,5. 08130, Santa Perpètua de la Mogoda, Barcelona, Spain;
[3]Zoological Institute, Department of Evolutionary Biology, Technische Universität Braunschweig, Mendelssohnstr. 4, 38106 Braunschweig, Germany
[4]Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain.

Keywords for indexing purposes
Calotriton arnoldi, genetic diversity, population structure, critically endangered, conservation genetics, effective population size

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

Running title: Consequences of habitat fragmentation

Abstract

Endemic species with restricted geographic ranges suffer potentially the highest risk of extinction and pose a special challenge for conservation. If these species are further fragmented into genetically isolated subpopulations, the risk of extinction might be even higher. Habitat fragmentation is generally considered to have negative effects on species survival, although there is also sporadic evidence for neutral or even positive effects. Nevertheless, these effects have been dismissed in conservation biology. Endemic to a small mountain range, the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) is one of Europe's amphibian species with the smallest distribution range (8 km^2) and is considered critically endangered according to the IUCN. Here, we analyzed its population structure using 24 microsatellite loci and found that habitat fragmentation due to a natural barrier has resulted in strong genetic division of populations into two sectors, with no detectable migration between sites. Although effective population size estimates suggested critically low values for all populations, we found very low levels of inbreeding or relatedness among individuals within populations. In contrast, genetic diversity in *C. arnoldi* is in the range and therefore comparable to populations of amphibian species with much larger distribution ranges. Our extensive study shows that natural habitat fragmentation had no negative effect on an evolutionary time scale and it seems that species may evolve reproductive strategies (e.g. mating preferences) to cope with rather small population sizes. Nevertheless, habitat fragmentation must be considered distinct from habitat loss or degradation. The effect of both should be regarded independently when planning the conservation strategies for an endangered species.

Introduction

Among threatened species, those that are endemic to a restricted spatial area should *per se* experience a higher risk of extinction. In general, the fragmentation of a species range into smaller subunits by external factors such as anthropogenic activities (Blank *et al.* 2013; Martínez-Cruz *et al.* 2007; Storfer *et al.* 2013) or climatic events (Garner *et al.* 2004; Veith *et al.* 2003; Zancolli *et al.* 2014) is known to pose a major threat, as gene flow among small or isolated sub-populations may be very restricted (Ewers & Didham 2006; Kim *et al.* 1998; Sunny *et al.* 2014). Long-term survival of these populations may be compromised due to stochastic and drift events (Sunny *et al.* 2014).

Therefore, one of the main goals in conservation biology is to identify the genetic structure and diversity of species at the population level and the current patterns of gene flow between populations (Apodaca *et al.* 2012 and references therein). The amount of gene flow among populations of a given species highly depends on its dispersal propensity (i.e. the probability of dispersal between habitat patches) and realized dispersal rates (Slatkin 1994). Organisms with lower dispersal rates are more susceptible to isolation than those with higher dispersal rates. Thus, dispersal may counteract the loss of gene flow among populations and, therefore, has been shown to be an important factor for the long-term survival of species (Allentoft & O'Brien 2010). Strong genetic differentiation among populations is a sign of interrupted gene flow and most likely a lack of dispersal of individuals between them. In conservation biology, mainly non-natural external factors such as human-induced changes are considered to have caused habitat fragmentation, hindering individuals to disperse (Templeton *et al.* 1990). However, both species-intrinsic and naturally driven processes might also lead to strong genetic differentiation of sub-populations which, in consequence, could have the same effect as non-naturally induced causes. Such processes may include, for example, differential habitat adaptation of populations (e.g. Manenti & Ficetola 2013; Steinfartz *et al.* 2007; Urban 2010; Vences & Wake 2007). In general, the division of a species into populations via habitat fragmentation has been considered to pose negative effects on species survival and persistence of populations. However, it has been suggested that in some instances habitat fragmentation can have neutral or even positive effects (Fahrig 2003; Templeton *et al.* 1990).

Amphibians are generally considered to have limited dispersal abilities, causing genetic differentiation across small geographic scales (Monsen & Blouin 2004 and references therein), although more recent studies indicate that in some cases dispersal propensities have been underestimated (e.g. Smith & Green 2005). The notable sensitivity of amphibians to environmental changes and habitat fragmentation are other factors that may reinforce patterns of sharp genetic discontinuities over short distances (Savage *et al.* 2010; Storfer *et al.* 2013; Velo-Antón *et al.* 2013). Therefore, data on gene flow among amphibian populations can also help in determining if a metapopulation structure exists (Marsh & Trenham 2001; Smith & Green 2005; Storfer 2003; Storfer *et al.* 2013). Whether populations of a given species act as a metapopulation has a direct influence on management programs and the appropriate conservation strategies that should be taken, such as determining the number of breeding lines and translocation actions (Neuwald & Templeton 2013; Sunny *et al.* 2014).

The Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) is only known from the Montseny Natural Park in the NE Iberian Peninsula and represents one of the most spatially restricted European amphibian species (Sillero *et al.* 2014). Here, its disconnected populations are found within a restricted altitudinal range in seven geographically close brooks. Although the historic range of this species is unknown, currently it occupies a total area of 8 km^2 (Amat & Carranza 2009). Moreover, its habitat is fragmented into two main sectors (eastern and western) on both sides of the Tordera River valley and separated by unsuitable terrestrial habitat. The current census population size of this species has been estimated to be less than 1500 adult individuals (Amat & Carranza 2005), whereas estimates for its effective population size are missing. Hence, *C. arnoldi* is one of the most endangered vertebrates in Europe and it is classified as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) (Carranza & Martínez-Solano 2009). Recent human activities such as the extraction of large amounts of water for commercial purposes, deforestation and the building of tracks and roads are disturbing the habitat and are affecting the species negatively (Amat 2005; Amat & Carranza 2006; Amat *et al.* 2014; Barber *et al.* 2014). A previous study based on mitochondrial (Cyt *b*) and nuclear (RAG-1) sequence analysis already suggested a high degree of genetic isolation between the eastern and western sectors, which is further supported by morphological differentiation (Valbuena-Ureña *et al.* 2013 – Chapter IV). Thus, the observed fragmentation of this species into highly genetically isolated populations is probably the result of an ancient naturally driven intrinsic fragmentation process rather than caused by the recent human disturbances mentioned above. However, a detailed analysis based on population structure, gene flow among populations and estimates of effective population sizes is still missing. All these studies are crucial for the understanding of past and ongoing evolutionary processes and their meaning for the conservation of such a spatially restricted endemic species.

Although there are several studies of species with very limited distribution ranges (e.g. Sunny *et al.* 2014; Wang 2009) and examples of amphibian species with highly structured populations (Blank *et al.* 2013; Blouin *et al.* 2010; Monsen & Blouin 2004; Savage *et al.* 2010), the critically endangered *C. arnoldi* represents an exceptional example to evaluate the positive or negative consequences of naturally driven species fragmentation in conservation. In this study, we aim at delineating the population structure of *C. arnoldi* by using a set of 24 polymorphic microsatellite loci markers with a special focus on relevant conservation parameters such as effective population size and diversity indices and discuss the implications of natural fragmentation for the conservation of endemic species with restricted spatial ranges.

Material and methods

Sample collection and genotyping

A total of 160 individuals of *C. arnoldi* were analyzed, including samples from all known seven local populations of this species (Fig. 1). For conservation reasons, the three eastern populations are herein referred to as A1, A2, A3, and the four western populations as B1, B2, B3 and B4. Samples included 77 individuals from the eastern sector (23 from A1, and 27 from each A2 and A3 populations) and 83 individuals from the western sector (25 from B1, 28 from B2, 26 from B3 and 4 from B4). B4 is the less represented population as a result of the low abundance of individuals at this site. Therefore, results from this population should be treated with caution.

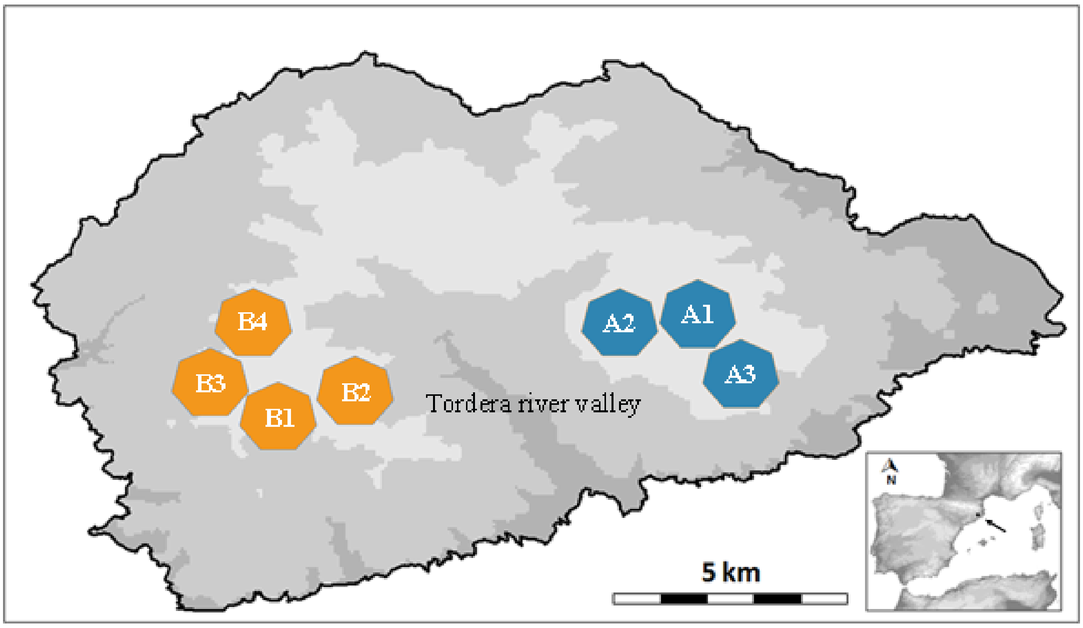


Figure 1. The distribution range of the Montseny brook newt, *Calotriton arnoldi*. All localities have been sampled for this study.

Tissue samples consisted of small tail or toe clips preserved in absolute ethanol. Genomic DNA was extracted using the QiagenTM (Valencia, California) DNeasy Blood and Tissue Kit following the manufacturer's protocol. Individuals were genotyped for a total set of 24 microsatellite loci: 15 specifically developed for *C. arnoldi* (Valbuena-Ureña *et al.* 2014 – Chapter V) and nine additional loci originally developed for the closely related sister species *C. asper* that cross-amplify successfully in *C. arnoldi* (Drechsler *et al.* 2013). Microsatellite loci were multiplexed in 5 mixes using the Type-it multiplex PCR (Qiagen). Primer combinations of the 5 mixes are provided in the supplementary material (Supp. Table 1). PCR conditions and genotyping of loci followed the descriptions provided in Drechsler *et al.* (2013).

Basic population genetic parameters

The MICRO-CHECKER software (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to check for potential scoring errors, large allele dropout and the presence of null alleles. Pairwise linkage disequilibrium between loci was checked using the software GENEPOP version 4.2.1 (Rousset 2008). The same program was used to calculate deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in each population and for each locus, which provides an exact probability value (Guo & Thompson 1992). Genetic diversity was measured for each sampling site as the mean number of alleles (A), observed (H_O) and expected heterozygosity (H_E) and allelic richness (Ar) using FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 1995). The observed number of private alleles for each locus and each population was calculated with GDA (Lewis & Zaykin 2000), and a rarified measure of private allele richness (PAAr) was obtained with HP-RARE (Kalinowski 2005). Overall and intrapopulation subdivision coefficients (F_{IS}) for all markers and sampling sites were calculated using FSTAT, which calculates the estimator f of Weir & Cockerham (1984) for each marker as well as a multilocus estimate.

Population structure analysis

The differentiation between all pairs of populations (F_{ST}) and the correct P values for population differentiation among pairs of populations were tested with FSTAT. The estimator D (Jost 2008) was also calculated using the R package DEMEtics (Gerlach *et al.* 2010) with 1000 bootstrap iterations to obtain P-values and confidence intervals. In addition, the programs STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) and GENETIX, version 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004) were used to analyze the population structure of *C. arnoldi* across its distribution range. STRUCTURE uses a Bayesian clustering algorithm and assigns individuals to clusters without using prior information on their localities of origin. Used settings included an admixture model with correlated allele frequencies and the number of inferred clusters (K) ranging from one (complete panmixia) to eight (i.e. the number of sample locations plus one), with10 runs for each K with one million Markov chain Monte Carlo (MCMC). Iterations were performed after a "burn in" period of 100,000. We also ran STRUCTURE with the same parameters for each sector (eastern and western) separately to check for possible genetic substructure within sectors. The optimal number of clusters was inferred using the ΔK method described by Evanno *et al.* (2005) as implemented in STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012). The average from all the outputs of each K was obtained with CLUMPP version 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) and then plotted with DISTRUCT version 1.1 (Rosenberg 2004). The degree of genetic differentiation of population k from the ancestral population was assessed by the estimator F_k obtained with STRUCTURE for each population cluster k. GENETIX software was also used to examine the population structure by performing a factorial correspondence analysis (FCA) on the allelic frequencies obtained for the seven Montseny brook newt populations. This analysis was performed across the distribution range of *C. arnoldi*, as well as in each sector separately to examine the existence of substructure within them. Analysis of molecular variance (AMOVA) was performed based on the results of STRUCTURE and grouping populations in ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010) based on 2000 permutations. Furthermore, isolation by distance (IBD) was evaluated by analyzing the relationship between geographical and genetic distances between populations with a Mantel test (Mantel 1967). Analyses were carried out separately among all sampled populations and for each sector with the software ARLEQUIN. Since the life style of *C. arnoldi* is strictly aquatic (Amat & Carranza 2009; Carranza & Amat 2005) distances were calculated following the watercourse and log-transformed to linearize the relationship between geographic distances and F_{ST} values (see Rousset 1997). Genetic distances were calculated as F_{ST} /(1- F_{ST}) and the significance of matrix correlation coefficients was estimated by 2000 permutations.

Analysis of recent gene flow

Recent gene flow events between sectors and among populations within sectors were assessed using three programs: GENECLASS 2.0 (Piry *et al.* 2004), STRUCTURE and BIMr (Faubet & Gaggiotti 2008). The program GENECLASS uses Bayesian criteria for calculating the probability that a certain individual comes from a particular population (Rannala & Mountain 1997). A Monte Carlo resampling algorithm (10000 simulated individuals, $\alpha = 0.01$) following the recommendations by Paetkau *et al.* (2004) was used for the probability computation. Detection of first-generation migrants was based on the ratio $L = L_h/L_{max}$, where L_h describes the likelihood to find an individual in its original population and L_{max} describes the maximum likelihood of assignment to any sampled population. This ratio is more powerful compared to other estimators such as L_h and is the most appropriate if all source populations have been sampled (Paetkau *et al.* 2004). The program STRUCTURE was reran with the option USEPOPINFO (i.e. prior sample site information). This program detects migrants by calculating a Q value that is the proportion of that individual's ancestry from a population. An individual is a putative migrant when its Q value for its origin site (Q_o) is significantly lower than the Q value for its site of assignment (Q_a). BIMR was used to estimate migration rates of recent gene flow ($N_{gen} \leq 2$) between populations within sectors. BIMR uses a Bayesian assignment test algorithm to estimate the proportion of genes derived from migrants within the last generation and assuming linkage equilibrium and allowing for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. We estimated migration rates among populations within sectors separately. For each analysis, a Markov chain using a burn-in period of 50,000 iterations, followed by 50,000 samples collected using a thinning interval of 50 was run. Convergence of the Markov chain was assessed by repeating the analyses independently five times. Pairwise migration rates between and within populations across runs were averaged.

Estimation of effective population size (N_e)

The effective population size (N_e) for each cluster resulting from STRUCTURE based on one-sample N_e estimator method was calculated with three programs: ONeSAMP (Tallmon *et al.* 2008), COLONY version 2.0.4.4 (Jones & Wang 2010), and LDNe version 1.31 (Waples & Do 2008). ONeSAMP employs approximate Bayesian computation and calculates eight summary statistics to estimate N_e from a sample of microsatellite loci genotypes. The analyses were submitted online to the ONeSAMP 1.2 server (http://genomics.jun.alaska.edu/asp/Default.aspx), which uses an Approximate Bayesian Computation method. After using different priors and obtaining similar results, values were specified to a minimum N_e value of 2 and a maximum N_e value of

100 and 500 for populations or clusters, respectively. COLONY implements a maximum likelihood method to conduct sibship assignment analyses, which are used to estimate N_e. COLONY results were calculated assuming random mating. Finally, N_e with the one-sample linkage disequilibrium method (Hill 1981) was calculated as implemented in LDNe obtaining confidence intervals with a jackknife method. The criterion P_{crit}=0.02 (alleles with frequency lower than 0.02 are excluded) was used as following the recommendations of Waples & Do (2010) to avoid bias caused by rare alleles but still getting a high precision.

Relatedness of individuals

In order to test the levels of endogamy, the software MLRELATE (Kalinowski *et al.* 2006) was used to estimate the relatedness among individuals within each population. This program is appropriate as it is designed for microsatellite loci, is based on maximum likelihood tests, and considers null alleles. Furthermore, GenAlEx v. 6 (Peakall & Smouse 2006) was used to obtain pairwise relatedness among individuals in each population separately using the r_{qg} estimator (Queller & Goodnight 1989). Mean pairwise relatedness values were calculated and compared with the 95% confidence interval (CI) estimates determined by 999 bootstrap resampling, at a sector level. Significant differences among mean population relatedness were tested using a permutation test (Peakall & Smouse 2006), and genotypes from all populations by sector were permuted 999 times and derived upper and lower 95% intervals for the expected range of r_{qg} based on all populations. These intervals represent the range of r_{qg} that would be expected under random mating across all populations within sectors. Population r_{qg} values that fall above the 95% expected values from permutations indicate increasing relatedness due to processes such as reproductive skew, inbreeding, or drift among populations within the same sector.

Results

Genetic diversity for each sampled population and cluster obtained from the genetic structure analyses is given in Table 1 (see Supp. Table 2 for locus-specific results). Loci Us3 and Us7 were monomorphic for populations within the western sector. We further found that some alleles were fixed for some populations: Calarn15906 was found to be monomorphic in population B2, seven loci (Calarn 29994, Calarn06881, Calarn36791, Calarn52354, Calarn31321, Calarn15136 and Us2) were fixed in population B3 and loci

Calarn15906 and Ca32 showed no polymorphisms in individuals of population B4. Observed number of alleles per locus ranged from four to 12 with a mean of 7.08 and mean number of alleles in the eastern and western populations were 5.50 and 3.96, respectively.

Table 1. Estimates of genetic parameters for each *Calotriton arnoldi* population and cluster. Values represent averages across 24 loci. N, sample size; A, number of alleles per locus; Ar, allelic richness; PA, number of private alleles; PAAr, allelic richness of private alleles; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; F_{IS}, inbreeding coefficient. Values in bold indicate statistical significance after Bonferroni correction.

Grouping	N	A	Ar	PA	PAAr	H_O	H_E	F_{IS}
Population								
A1	23	4,167	4,167	7	0,311	0,545	0,538	0,017
A2	27	4,042	3,954	5	0,214	0,526	0,516	-0,015
A3	27	4,292	4,222	5	0,215	0,560	0,559	-0,007
B1	25	3,542	3,500	3	0,137	0,467	0,469	-0,005
B2	28	2,917	2,860	2	0,087	0,371	0,380	0,028
B3	26	1,792	1,768	2	0,079	0,230	0,197	-0,121
B4	4	2,333	-	0	-	0,438	0,433	-0,023
Clusters								
Eastern	77	4,167	4,112	75	3,157	0,544	0,538	**0,090**
A1-A2	50	4,099	4,052	19	0,746	0,535	0,526	0,029
Western	83	2,724	2,703	38	1,646	0,359	0,352	**0,184**
B1-B2-B4	57	3,150	3,162	19	0,750	0,418	0,423	**0,073**

There was no sign of linkage disequilibrium between any pair of loci with the only exception of Calarn02248 and Calarn50748 in population B3 after Bonferroni correction (P>0.00018). Only two loci in two different populations showed signs of null alleles (Us7 in A1 and Ca22 in B1). Private alleles (PA) – defined here as alleles exclusively found in a single population throughout the study site, i.e. the species range – are also listed in Table 1. Populations of the eastern sector had 75 PAs, while the western populations had 38 PAs. Allelic richness (AR) per population ranged from 1.77 to 4.22, and expected heterozygosity ranged from 0.197 to 0.559 (weighted average: 0.441) with the lowest value found in B3 and the highest in A3. No significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium (P>0.0003) were found after applying Bonferroni correction. Overall, F_{IS} was estimated to 0.380 (P=0.0021), but this parameter did not show values significantly different from zero for each population after applying Bonferroni correction (see Table 1).

Determining population structure

Population differentiation was significant for each pair of population combination (P<0.001) for any of the parameters used (Table 2).

Table 2. Genetic differentiation among populations. Pairwise F_{ST}, below the diagonal; D estimator values, above the diagonal. All P values were significant ($P < 0.001$).

F_{ST}/D	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4
A1	-	0,131	0,243	0,814	0,816	0,852	0,782
A2	0,086	-	0,299	0,855	0,868	0,877	0,822
A3	0,151	0,178	-	0,806	0,801	0,858	0,762
B1	0,457	0,473	0,443	-	0,100	0,249	0,122
B2	0,509	0,524	0,491	0,096	-	0,248	0,146
B3	0,614	0,617	0,599	0,336	0,372	-	0,305
B4	0,443	0,460	0,419	0,109	0,145	0,488	-

F_{ST} values between populations of the eastern *versus* the western sector ranged from 0.443 to 0.617 and estimator D values ranged from 0.801 to 0.877. Pairwise comparisons among populations within sectors were much lower, with F_{ST} and D values within sectors ranging from 0.086 to 0.372 and 0.100 to 0.299, respectively. Population B4 was not included in the F_{ST} and D estimations due to its low sample size (only four individuals). Populations A3 of the eastern and B3 of the western sector were the most differentiated populations when compared with their respective sector populations.

STRUCTURE analysis revealed two highly distinct genetic clusters corresponding to populations included in the eastern and the western sectors (Fig. 2), and the degree of genetic differentiation of each sector from the ancestral population (F_k estimates) was 0.229 and 0.479, respectively.

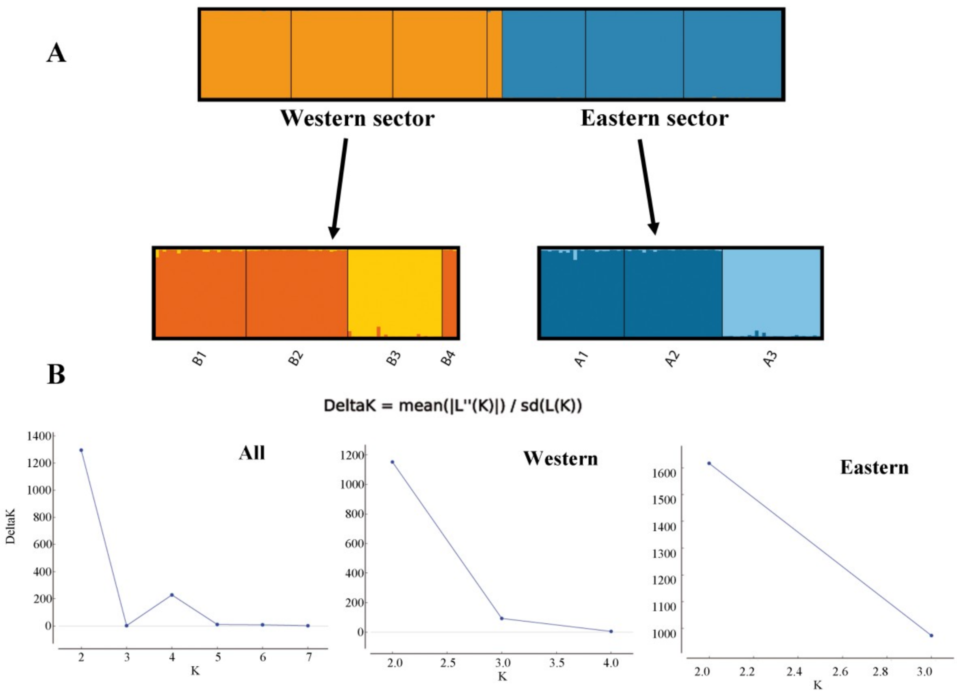


Figure 2. A, Results of Bayesian clustering and individual assignment analysis obtained with STRUCTURE after running the program with all populations (above) and by sector (below); vertical bars delimit sampling locations. B, inference for the best value of K based on the ΔK method among runs for all populations and by sector.

These values indicate that populations of the western sector have differentiated more from the potential ancestral population than the ones of the eastern sector. The existence of two clusters was highly supported by the analysis of ΔK values corresponding to K = 2 (Fig. 2b). Some evidence for additional substructure is also observed by a second weak peak at K = 4. When each sector was analyzed independently, two genetic clusters were identified for each sector, grouping A1-A2 separately from A3, and B1-B2-B4 separately from B3 (Fig. 2a). Within the western sector, population B3 presented relatively high values of differentiation from the ancestral population (F_k = 0.640). The same general results were also found with the FCA (Fig. 3), with the clear separation between the two sectors.

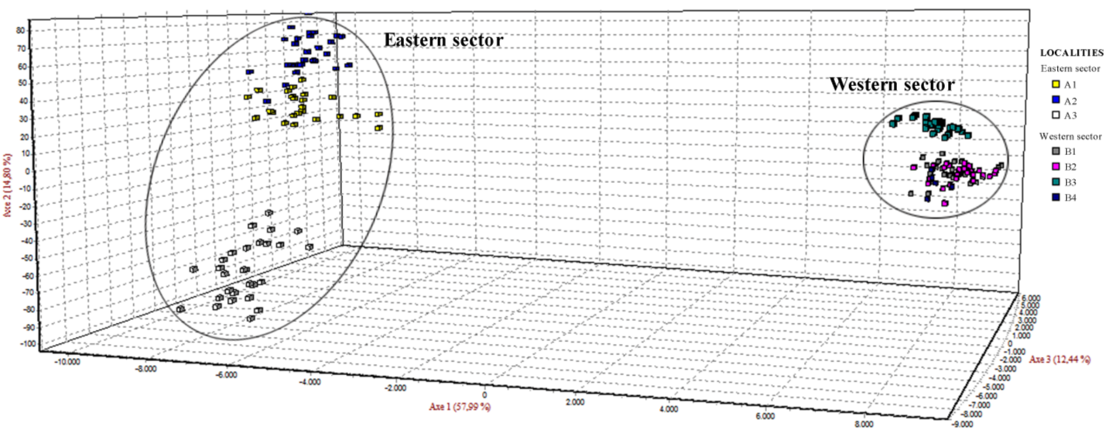


Figure 3. Population structure based on factorial correspondence analysis of all populations. Each square represents an individual multilocus genotype colored according to the location from where it was sampled.

In these results, the A3 and B3 populations also appeared as the most distinct ones in their respective sectors. The results of the a posteriori AMOVA revealed that the clusters resulting from STRUCTURE (K=2) explained 40.81% of the molecular variance, 11.61% was explained by among populations within groups and 48.31% by within population variation. These results agree with the population differentiation analysis (F_{ST} values; Table 2).

A relationship between genetic differentiation and geographical distance (Supp. Table 3) is found among all sampled populations (Fig. 4, r=0.735, P = 0.020), suggesting a strong isolation by distance at the level of all populations. However, at a finer scale, when both sectors were analyzed independently, no isolation by distance was observed.

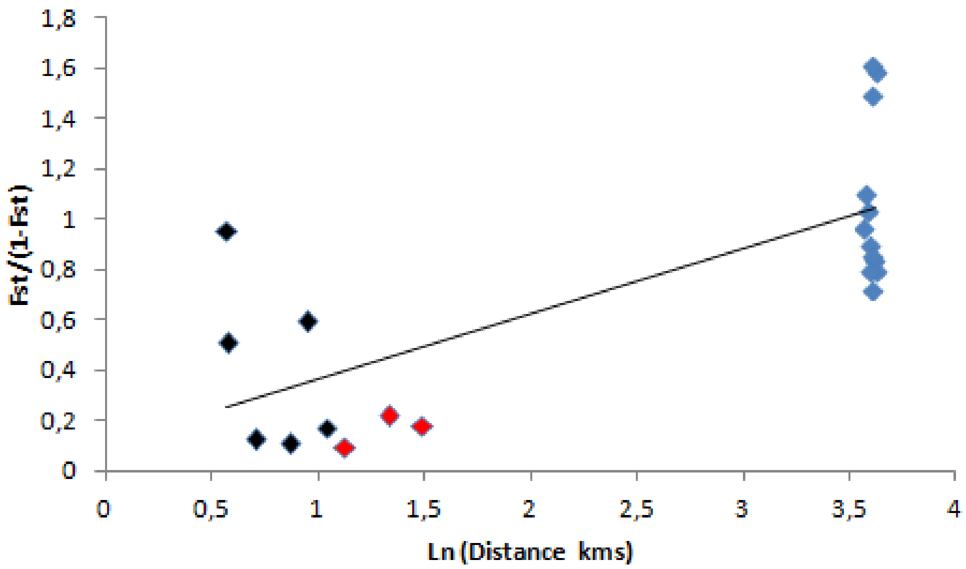


Figure 4. Isolation by distance between populations. Blue symbols represent among sectors comparisons; red and black symbols represent among populations comparisons of eastern and western sectors, respectively.

Recent gene flow and migration rates

No migration between sectors could be detected by any of the three programs. Individuals of the eastern sector were assigned by GENECLASS with more than 90% or higher probability to their population of origin. In the western sector, 96% of individuals originating from B1 and 88% of individuals originating from B3 were correctly assigned to their population of origin. A total of 10.7% of individuals from population B2 were assigned to B4, 17.9% to B1 and the rest (71% of individuals) to their population of origin. Some 8.7% or less of the individuals were not assigned to any of the populations sampled. No first-generation migrants were detected among populations from the eastern sector, and in the western sector only one individual from B2 was detected to be migrant from B1 (P = 0.001). Although this individual had a low probability to be migrant from B1 (probability of migration of 0.008 regarding the results of STRUCTURE), the estimated membership coefficients calculated by STRUCTURE showed a probability of 0.231 to have a single parent from population B1. STRUCTURE results were similar to GENECLASS assignments, with over 98% of the sampled individuals being assigned to their population of origin. Estimates of recent gene flow using BIMr were consistent among the five independent runs suggesting that convergence of the Markov chain had been reached. Recent migration rates resulted in no detectable recent gene flow among populations in either eastern or western sector (Suppl. Table 4). The overall output of recent gene flow and migration rates are according to the population structure detected above.

Effective sample size, *Ne*

All three independent methods used to estimate the effective population sizes (N_e) of the two genetic clusters (i.e. sectors) and populations provided rather low and critical values (see Table 3). Estimation of the 95% CI upper limit for populations A1 and A3 was problematic (estimated at infinity or incongruence values) in the linkage disequilibrium method (LDNe). Despite slight differences between methods, all showed narrow confidence intervals thus supporting the consistence of received estimates. Effective population sizes were particularly low in population B3, with a 95% CI estimate of N_e = 2-30.

Relatedness of individuals

The proportion of individual relatedness within each population was similar (Table 3), with most individuals being highly unrelated with each other with percentages higher than 80%. The only exception was population B3 with a low percentage of the specimens unrelated (68.3%). Full sibling and parent-offspring relations in B3 represented the 12.31% and 11.38%, respectively, while the other populations showed much lower percentages not exceeding 4%. The estimated Queller & Goodnight (1989) index of relatedness calculated among individuals in each population separately indicated random mating among individuals within each population (A1, r_{qg} = -0.045; A2, r_{qg} = -0.038; A3, r_{qg} = -0.038; B1, r_{qg} = -0.042; B2, r_{qg} = -0.037; B3, r_{qg} = -0.067; B4, r_{qg} = -0.333). Instead, at a sector level, most populations had significantly higher degrees of relatedness than expected from the null distribution if sectors were in panmixia, which corroborated the observed genetic substructure within each sector (see Fig. 5), suggesting that there is no random mating among individuals from distinct populations within sectors. Although r_{qg} estimates within most populations were statistically higher than expected, values among most of them were similar and not exceedingly high (Fig. 5), with the only exception of population B3, which showed an average pairwise relatedness (r_{qg}) of 0.745 (upper and lower CI estimates at 95% of 0.759 and 0.730, respectively). Values for the other populations ranged from 0.150 to 0.206 and from 0.019 to 0.231 within the eastern western sectors, respectively.

Table 3. Estimates of effective population size (N_e) for each population and cluster calculated with three programs: LDNe, ONeSAMP and COLONY; estimations of the upper and lower 95% CI estimates for each method are indicated. Relationship indicates the percentage of individual relatedness within each population and cluster.

Grouping	LDNe			OneSamp			COLONY			Relationship			
Population	N_e	95% CIs		N_e	95% CIs		N_e	95% CIs		Unrelated	Half Siblings	Full Siblings	Parent Offspring
A1	342.30	77.00	infinite	27.65	24.51	34.81	46.00	26.00	90.00	91.70	7.51	0.40	0.40
A2	49.40	32.20	93.20	33.94	29.94	41.89	40.00	25.00	71.00	90.31	7.12	0.85	1.71
A3	142.10	61.80	infinite	36.85	33.33	43.20	44.00	28.00	80.00	91.17	7.98	0.28	0.57
B1	55.80	34.10	126.40	31.59	27.77	40.69	35.00	20.00	68.00	86.33	12.00	0.67	1.00
B2	62.20	27.50	15091.10	36.39	30.46	53.44	31.00	18.00	57.00	81.75	13.23	1.85	3.17
B3	7.30	2.40	21.70	14.97	12.61	19.61	13.00	7.00	30.00	68.31	8.00	12.31	11.38
B4	infinite	infinite	infinite	5.54	4.87	6.64	-	-	-	100	-	-	-
Clusters													
A1-A2	44.50	36.00	56.50	85.95	66.52	127.10	60.00	41.00	92.00	84.16	14.37	0.57	0.90
B1-B2-B4	30.00	23.60	39.00	80.14	55.44	157.01	42.00	27.00	66.00	80.89	15.91	1.50	1.69

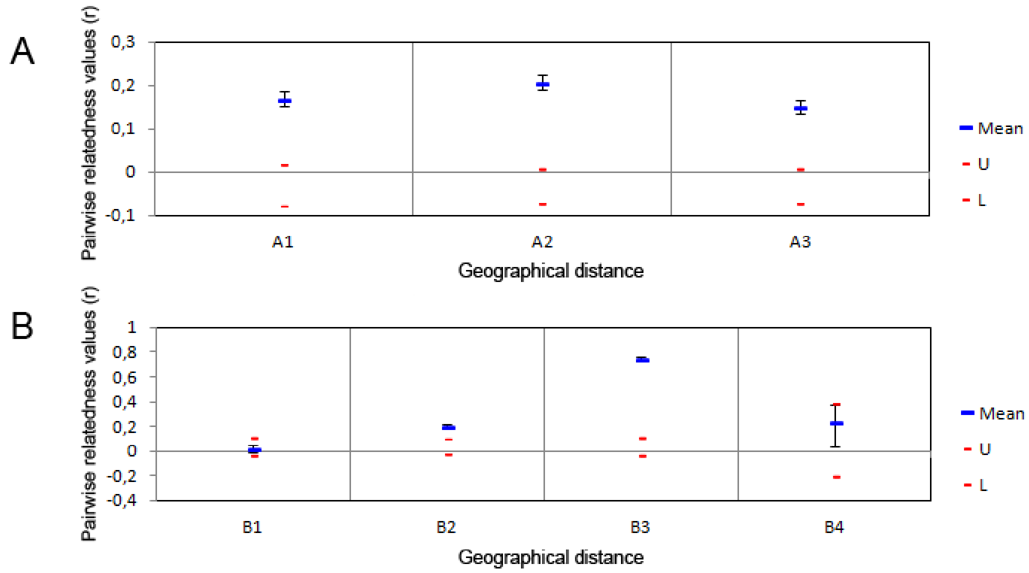


Figure 5. Mean within-population pairwise relatedness values (r_{qg}) between populations of eastern (A) and western (B) sectors. Red bars represent the upper (U) and lower (L) confidence intervals with 95 % confidence with a null distribution generated with 999 permutations. Blue bars represent the observed kinship mean conducted with 999 bootstraps.

Discussion

In general, habitat fragmentation leading to the subdivision of a species range into smaller subunits is considered to have a negative effect on species survival (Blank *et al.* 2013; Casas-Marce *et al.* 2013; Martínez-Cruz *et al.* 2007). However, according to Fahrig (2003), neutral or even positive effects can arise as a result of habitat fragmentation. In terms of genetic diversity, habitat fragmentation should lead to a decrease in genetic diversity due to random processes (e.g. genetic drift) that have a stronger effect in small populations (Leimu *et al.* 2006). Therefore, species restricted to small geographic areas should experience a high danger of extinction if populations become fragmented and isolated from each other. We are here studying an extreme case of population subdivision due to natural habitat fragmentation in an endangered endemic newt species, *Calotriton arnoldi*, and ask whether observed strong population subdivision due to habitat fragmentation really has an overall negative effect on this species. The fact that subpopulations of *C. arnoldi* show signs of morphological as well as genetic divergence, even for more slowly evolving genes, indicates that fragmented subpopulations must have existed already over a long evolutionary time scale. Accordingly, this specific system also allows further conclusions on the long-term effect of habitat fragmentation in an endemic and restricted species. We discuss below our empirical data, which shows that species may have persisted with long-term fragmentation of habitat despite small effective population sizes.

Patterns of genetic diversity in *C. arnoldi*

Overall, it appears that across its distribution range the Montseny brook newt is characterized by moderate levels of genetic diversity and high genetic differentiation among sites. Genetic diversity of this species along its distribution range (weighted average H_E=0.441) tends to be similar to other salamanders and temperate amphibians, which show H_E averages ranging from 0.4-0.6 (Chan & Zamudio 2009 and references therein). Given that small populations tend to have low values of genetic variation due to random genetic drift, inbreeding or the accumulation of deleterious mutations (Frankham *et al.* 2010), a low observed genetic diversity was expected. The overall observed heterozygosity of *C. arnoldi* has been compared to some *C. asper* populations by performing a Wilcoxon ranked test, and no significant differences were detected (Drechsler *et al*. 2013; Valbuena-Ureña *et al*. unpublished data). Therefore, although *C. arnoldi* has a much smaller distribution range than *C. asper*, values of genetic diversity are similar and higher than expected for a critically endangered and isolated amphibian species with a very small population size (see Storfer *et al.* 2013 for an overview).

Our results clearly show that *C. arnoldi* populations are highly structured over short geographic distances and differentiated into an eastern and a western sector (Fig. 2). This finding is also supported by differences in morphology as well as mitochondrial and nuclear coding genes (Valbuena-Ureña *et al.* 2013 – Chapter IV), suggesting that the fragmentation into subpopulations is not a recent event and that it is likely the result of natural processes. Sectors are genetically highly different with no gene flow between them as indicated by a high number of private alleles in each sector (75 and 38 in the eastern and western sectors, respectively) and by the AMOVA results, high F_{ST} values, unambiguous genetic assignment of individuals, and observed isolation by distance. Since *C. arnoldi* is exclusively aquatic (Carranza & Amat 2005), dispersal can only occur along watercourses. This is in agreement with the levels of genetic differentiation observed, which are notably higher than values typically found in studies of other amphibians that use both aquatic and terrestrial habitats (Spear *et al.* 2005). Accordingly, sectors are effectively isolated for *C. arnoldi* by a 37 km long watercourse, whereas distance by air is only 6 km. The fact that the watercourse between the two sectors passes through a completely adverse environment for this species, including a low altitude wide river with potential predators (Tordera River; Carranza & Amat 2005), has resulted into a strong migration barrier for these aquatic newts. Accordingly, we can assume that in this system natural fragmentation has a strong impact on observed and associated microevolutionary processes (see Sarasola-Puente *et al.* 2012; Templeton *et al.* 1990; Wang 2009).

The high number of private alleles and the high degree of allelic fixation (PAAr) within each sector (Table 1) suggests the role of long-term isolation between sectors and small-effective population size (Milá *et al.* 2010). Values of genetic variability (observed heterozygosities) were significantly different between sectors. Genetic variability of the populations within the eastern sector is generally higher than genetic variability in the populations from the western sector. Also, the number of alleles per locus as well as allelic richness is almost twice in the eastern sector for these parameters. Moreover, all 24 loci were polymorphic for the eastern sector while some of them were monomorphic (fixed) for the western populations. These results match with the higher level of genetic variability for mitochondrial and nuclear DNA sequences within the eastern sector (Valbuena-Ureña *et al.* 2013 – Chapter IV). Differences in their recent population history may be a reason for the differences in genetic variability between sectors (Jensen *et al.* 2013). Time since colonization and effective population size after colonization are important to consider when interpreting differences in the levels of genetic variation among populations (Jensen *et al.* 2013). Depletion of genetic variation occurs when a new population is established by a very small number of individuals from a larger population, i.e. founder effect (Nei *et al.* 1975) and genetic drift (Jensen *et al.* 2013). It is also considered that low allelic richness, low heterozygosity, and increased numbers of monomorphic loci to be an indicator of a bottlenecked population, as excess heterozygosity diminishes over time if the population size remains small (Richmond *et al.* 2013). Our results suggest that the western sector has differentiated more from the potential ancestral population than the eastern sector, as low genetic diversity values for the western populations may indicate that the isolation process is ancient enough to be detected (Sarasola-Puente *et al.* 2012). Additionally, the higher degree of genetic differentiation from the ancestral population (F_k) obtained for the western sector agrees with its lower population size and its probable longer isolation (Casas-Marce *et al.* 2013).

Estimates of genetic clusters and PCA analysis were consistent with each other regarding intra-sector differentiation. Two clusters are detected in each sector, being populations A3 and B3 isolated from the other populations, each forming a different cluster (Fig. 2). Moreover, dispersal among populations within sectors is very low, not only on the basis of the migration tests. The significant F_{ST} values indicate that dispersal among populations is low and confirm the differentiation of populations A3 and B3 from the other populations within their respective sectors. Moreover, most populations showed significantly higher degrees of relatedness (r_{qg}) than expected if sectors were in panmixia. This pattern is expected when migration among populations is not sufficiently high to counteract relatedness that results from nonrandom mating among populations.

Advantage or burden – how to interpret the impact of natural fragmentation in *C. arnoldi*

It is broadly accepted that habitat fragmentation will result into the subdivision of populations and, if migration of individuals is not possible, subpopulations will start to diverge genetically (Frankham *et al.* 2010; Templeton *et al.* 1990). It is also important to differentiate between human induced (i.e. non-natural) and naturally caused (as it is the case in *C. arnoldi*) processes of habitat fragmentation. We would like to focus our discussion here on the effects of natural habitat fragmentation. In their influential paper, Templeton *et al.* (1990) pointed out the genetic consequences of natural habitat fragmentation for a set of quite distinct taxa in a restricted mountain range. Highlighting mainly the possible negative consequences of species fragmentation, they also concluded that, on the positive side, genetic variation of a fragmented species is not totally lost but often present as fixed differences between local populations (Templeton *et al.* 1990). Although this aspect might be rather relevant for species conservation, the scientific community has never considered it seriously. In our view, natural habitat fragmentation and its consequences on population structure in *C. arnoldi* provide an excellent system to discuss this so far overlooked aspect.

It is quite obvious that the census as well as effective population sizes observed in *C. arnoldi* ranks it as a critically endangered species; N_e values for all *C. arnoldi* populations were critically low (<50) and are consistent with the small found census size (Amat & Carranza 2005). In conservation biology, a N_e of 500 has been suggested as a minimum value for the long-term survival of a species, whereas N_e values below 50 in isolated populations are of major concern, as these populations have an increased probability of extinction as a result of genetic effects (Allendorf & Luikart 2007;

Hurtado *et al.* 2012) and stochastic processes. However, despite the critically low estimated values of N_e for all *C. arnoldi* populations (Table 3), the lack of gene flow between sectors and the extremely low level of gene flow between populations within sectors (Fig. 2), this species has probably survived for a long period of time in this area. Without considering the evolutionary history of a certain species, one should expect that small N_e estimates in a population may induce to high inbreeding coefficients as well as a high level of relatedness among individuals of a given population. However, F_{IS} values for populations were not significant and estimates of relatedness (r_{qg}) among individuals at each population were unexpectedly low. Also, the percentages of unrelated relationships exceed 80% in all populations but population B3 (68%). One possible explanation for this phenomenon could be that *C. arnoldi* has evolved mating strategies to maximize outbreeding of individuals within a population, i.e. a preference for mating with genetically more dissimilar partners. That female of distinct amphibian species are capable of mating preferentially has been already shown for distinct species. In newts, it has been shown that females mate with genetically more dissimilar males in condition-dependent choice situations (Garner & Schmidt 2003), whereas in terrestrial salamanders, females preferred genetically more similar males under complete natural conditions (Caspers *et al.* 2014) in the context of habitat adaptation (Steinfartz *et al.* 2007). Females of all salamandrid species, including also *C. arnoldi*, can store the sperm from multiple matings in special cloacal glands (so called *receptaculum seminis*) for later fertilization. Sperm storage and multiple paternities are common among salamanders and newts (Caspers *et al.* 2014; Kühnel *et al.* 2010; Steinfartz *et al.* 2006). We can also assume that females of *C. arnoldi* do sperm storage (Alonso 2013) and therefore, have the potential to increase the genetic diversity of their offspring by mating with multiple and maybe preferentially genetically dissimilar males. Thus, in terms of maintaining genetic diversity, small effective population sizes do not necessarily impose a problem, as there may be other reproductive or behavioral mechanisms that counteract the effect of genetic drift (Allentoft & O'Brien 2010). Therefore, a better knowledge of the species' biology, such as these reproductive strategies, will help to understand how the genetic diversity of this species is maintained across generations.

Our results indicate that the overall genetic diversity of *C. arnoldi* across its distribution range has been maintained relatively high despite the small area of occupancy. Therefore, species fragmentation in this case should be regarded as advantageous. Populations of *C. arnoldi* do not show low levels of intrapopulation genetic diversity and signs of inbreeding, which are a typical by-product of habitat fragmentation. Also, one might further speculate that if a species consists of completely independent and isolated populations, as being the case here, a bet hedging strategy of isolated populations in the face of local extinction might prevent the extinction of the whole species. Especially in the event of epidemic infections, which have been shown to be particularly dangerous for amphibians by driving complete populations and even species to extinction (Bosch *et al.* 2001; Earl & Gray 2014; Martel *et al.* 2013; Skerratt *et al.* 2007; Spitzen-Van Der Sluijs *et al.* 2013). Small populations are more likely to go extinct due to stochastic processes and genetic effects. However, if populations are completely isolated and the contact and exchange between individuals through migration does not take place, single populations might survive an epidemic outbreak enabling the survival of the species.

Implications for the conservation

Impacts of habitat fragmentation must be measured independently from effects of habitat loss or degradation. Population isolation caused by the breaking apart of habitat might have either positive or negative effects depending on the species. As stated before, *C. arnoldi* seems to have coped with natural habitat fragmentation very well. However, the effects of habitat loss may outweigh the effects of habitat fragmentation and have important implications for conservation. Habitat loss has been widely recognized to have large and consistently negative effects on biodiversity, affecting negatively species richness, population abundance and distribution and genetic diversity (Fahrig 2003 and references therein). The low effective population sizes entail that habitat loss or degradation could drive very rapidly such small populations to extinction. Stochastic factors could cause high mortalities when species have very small distribution ranges. Although natural fragmentation has been demonstrated to involve neutral or positive effects to the survival of a certain species, the effects of habitat loss may be detected when the habitat is highly and rapidly fragmented. Intensifying habitat fragmentation causes an increase in the amount of edge in the landscape. That enlarges the probability of individuals leaving the breeding habitat and increases the habitat needed for persistence (Fahrig 2001). This implies that one main question that should be considered for the conservation of a certain species is probably "how much habitat is enough?" Different species require distinct amounts of habitat for persistence.

Therefore, the conservation of a vulnerable or endangered species requires estimating the minimum habitat required for persistence of the given species. In addition, many species require more than one kind of habitat within a life cycle. Therefore, landscape patterns that maintain the required habitat amounts should be covered (Fahrig 2003).

Species surviving in fragmented habitats are, overall, likely to suffer genetic erosion, compared to populations living in continuous habitats (Rivera-Ortiz *et al*. 2014). This study is an example of species that have evolved beneficial strategies to cope with habitat fragmentation. Therefore, it is crucial to determine the level of evolutionary potential of a given species and to characterize the specialized ecological requirements and life history traits of a given species.

Understanding the current genetic population structure and gene flow among populations contribute valuable information in the guidance and management of conservation programs (Boessenkool *et al.* 2009; Leonard 2008; Shepherd & Lambert 2008). The definition of appropriate conservation units are crucial for maintaining the distinct evolutionary lineages and the species' evolutionary potential (Frankham *et al.* 2010). In *C. arnoldi,* the evolutionary potential is not only manifested within the species as a whole but rather within each sector. Therefore, conservation strategies should be adopted to make sure that the evolutionary potential and the genetic diversity within the distinct groups are not lost (Hoffman & Blouin 2004). Outcrossing among them is not a recommended management strategy in order to avoid outbreeding depression (Frankham *et al*. 2011, Sagvik *et al*. 2005, Sherman *et al*. 2008). Furthermore, before any translocations are done it is important to evaluate whether individuals have evolved local adaptation and to clarify at what degree they show ecological exchangeability (Blank *et al.* 2013; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005). Thus, for all these reasons expressed above, conservation strategies should focus on habitat preservation and restoration in each evolutionary group with the aim of maintaining the strong population structure highlighted in this study.

Acknowledgements

We are grateful to all members of the CRFS Torreferrussa, and especially to M. Alonso, F. Carbonell, E. Obon and R. Larios. We also thank the DAAM department of the Generalitat de Catalunya, the staff of Parc Natural del Montseny of the Diputació de Barcelona, and F. Amat. This research was supported by Miloca and Zoo de Barcelona (PRIC-2011). S.C. is supported by a grant CGL2012-36970 from the Ministerio de

Economía y Competitividad, Spain (co-funded by FEDER). We thank Ralf Hendrix for performing the primary microsatellite loci analysis in the laboratory.

References

Alonso M (2013) *Influència de l'edat en la cria en captivitat del Tritó del Montseny (Calotriton arnoldi)* Final grade report, Universitat de Lleida.

Allendorf FW, Luikart G (2007) *Conservation and the Genetics of Populations* Blackwell, Oxford.

Allentoft M, O'Brien J (2010) Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review. *Diversity* **2**, 47-71.

Amat F (2005) Estat de conservació del tritó pirinenc (*Euproctus asper*) a la Reserva de la Biosfera i Parc Natural del Montseny. In: *VI Trobada d'estudiosos del Montseny* (ed. Barcelona Dd), pp. 119-121.

Amat F, Carranza S (2005) Estudi demogràfic del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) al Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny, pp. 85-86. Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona, Barcelona.

Amat F, Carranza S (2006) Projecte de conservació del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) en l'àmbit del Parc Natural del Montseny, pp. 88-89. Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona, Barcelona.

Amat F, Carranza S (2009) Projecte de conservació del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) a l'àmbit del PN-MaB del Montseny, pp. 88-89. Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona, Barcelona.

Amat F, Carranza S, Valbuena-Ureña E, Carbonell F (2014) Saving the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) from extinction: an assessment of eight years of research and conservation. *Froglog* **22**, 55-57.

Apodaca J, Rissler L, Godwin J (2012) Population structure and gene flow in a heavily disturbed habitat: implications for the management of the imperilled Red Hills salamander (*Phaeognathus hubrichti*). *Conservation Genetics* **13**, 913-923.

Barber J, Guinart D, Solórzano S, Vicens N (2014) Pla de conservació del Parc Natural del Montseny. Reserva de la Biosfera, p. 561. Diputació de Barcelona, Barcelona.

Belkhir K, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000: Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Blank L, Sinai I, Bar-David S, Peleg N, Segev O, Sadeh A, Kopelman NM, Templeton AR, Merilä J, Blaustein L (2013) Genetic population structure of the endangered fire salamander (*Salamandra infraimmaculata*) at the southernmost extreme of its distribution. *Animal Conservation* **16**, 412-421.

Blouin M, Phillipsen I, Monsen K (2010) Population structure and conservation genetics of the Oregon spotted frog, *Rana pretiosa*. *Conservation Genetics* **11**, 2179-2194.

Boessenkool S, Star B, Waters JM, Seddon PJ (2009) Multilocus assignment analyses reveal multiple units and rare migration events in the recently expanded yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology* **18**, 2390-2400.

Bosch J, Martínez-Solano I, García-París M (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* **97**, 331-337.

Carranza S, Amat F (2005) Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula. *Zoological Journal of the Linnean Society* **145**, 555-582.

Carranza S, Martínez-Solano I (2009) *Calotriton arnoldi.* IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1

Casas-Marce M, Soriano L, López-Bao JV, Godoy JA (2013) Genetics at the verge of extinction: insights from the Iberian lynx. *Molecular Ecology* **22**, 5503-5515.

Caspers BA, Krause ET, Hendrix R, Kopp M, Rupp O, Rosentreter K, Steinfartz S (2014) The more the better – polyandry and genetic similarity are positively linked to reproductive success in a natural population of terrestrial salamanders (*Salamandra salamandra*). *Molecular Ecology* **23**, 239-250.

Chan LM, Zamudio KR (2009) Population differentiation of temperate amphibians in unpredictable environments. *Molecular Ecology* **18**, 3185-3200.

Drechsler A, Geller D, Freund K, Schmeller DS, Künzel S, Rupp O, Loyau A, Denoël M, Valbuena-Ureña E, Steinfartz S (2013) What remains from a 454 run: estimation of success rates of microsatellite loci development in selected newt species (*Calotriton asper*, *Lissotriton helveticus*, and *Triturus cristatus*) and comparison with Illumina-based approaches. *Ecology and Evolution* **3**, 3947-3957.

Earl D, vonHoldt B (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361.

Earl J, Gray M (2014) Introduction of Ranavirus to Isolated Wood Frog Populations Could Cause Local Extinction. *EcoHealth*, 1-12.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.

Ewers RM, Didham RK (2006) Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews* **81**, 117-142.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.

Fahrig L (2001) How much habitat is enough? *Biological Conservation* **100**, 65-74.

Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**, 487-515.

Faubet P, Gaggiotti OE (2008) A New Bayesian Method to Identify the Environmental Factors That Influence Recent Migration. *Genetics* **178**, 1491-1504.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2010) *Introduction to Conservation Genetics*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR, Fenster CB (2011) Predicting the Probability of Outbreeding Depression. *Conservation Biology* **25**, 465-475.

Garner TWJ, Pearman PB, Angelone S (2004) Genetic diversity across a vertebrate species' range: a test of the central–peripheral hypothesis. *Molecular Ecology* **13**, 1047-1053.

Garner TWJ, Schmidt BR (2003) Relatedness, body size and paternity in the alpine newt, *Triturus alpestris*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **270**, 619-624.

Gerlach G, Jueterbock A, Kraemer P, Deppermann J, Harmand P (2010) Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! *Molecular Ecology* **19**, 3845-3852.

Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.

Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.

Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetics Research* **38**, 209-216.

Hoffman EA, Blouin MS (2004) Historical data refute recent range contraction as cause of low genetic diversity in isolated frog populations. *Molecular Ecology* **13**, 271-276.

Hurtado L, Santamaria C, Fitzgerald L (2012) Conservation genetics of the Critically Endangered Saint Croix ground lizard (*Ameiva polops* Cope 1863). *Conservation Genetics* **13**, 665-679.

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806.

Jensen H, Moe R, Hagen IJ, Holand AM, Kekkonen J, Tufto J, Sæther B-E (2013) Genetic variation and structure of house sparrow populations: is there an island effect? *Molecular Ecology* **22**, 1792-1805.

Jones OR, Wang J (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* **10**, 551-555.

Jost L (2008) GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* **17**, 4015-4026.

Kalinowski ST (2005) hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* **5**, 187-189.

Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* **6**, 576-579.

Kim I, Phillips CJ, Monjeau JA, Birney EC, Noack K, Pumo DE, Sikes RS, Dole JA (1998) Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Molecular Ecology* **7**, 667-678.

Kraaijeveld-Smit FJL, Beebee TJC, Griffiths RA, Moore RD, Schley L (2005) Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. *Molecular Ecology* **14**, 3307-3315.

Kühnel S, Reinhard S, Kupfer A (2010) Evolutionary reproductive morphology of amphibians: an overview. *Bonn Zoological Bulletin* **57**, 119-126.

Leimu R, Mutikainen PIA, Koricheva J, Fischer M (2006) How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology* **94**, 942-952.

Leonard JA (2008) Ancient DNA applications for wildlife conservation. *Molecular Ecology* **17**, 4186-4196.

Lewis PO, Zaykin D (2000) Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data, Version 1.0. (d15), University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA.

Manenti R, Ficetola GF (2013) Salamanders breeding in subterranean habitats: local adaptations or behavioural plasticity? *Journal of Zoology* **289**, 182-188.

Mantel N (1967) The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.

Marsh DM, Trenham PC (2001) Metapopulation Dynamics and Amphibian Conservation. *Conservation Biology* **15**, 40-49.

Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Blooi M, Bert W, Ducatelle R, Fisher MC, Woeltjes A, Bosman W, Chiers K, Bossuyt F, Pasmans F (2013) Batrachochytrium salamandrivorans sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 15325-15329.

Martínez-Cruz B, Godoy JA, Negro JJ (2007) Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish imperial eagle. *Molecular Ecology* **16**, 477-486.

Milá B, Carranza S, Guillaume O, Clobert J (2010) Marked genetic structuring and extreme dispersal limitation in the Pyrenean brook newt *Calotriton asper* (Amphibia: Salamandridae) revealed by genome-wide AFLP but not mtDNA. *Molecular Ecology* **19**, 108-120.

Monsen KJ, Blouin MS (2004) Extreme isolation by distance in a montane frog *Rana cascadae*. *Conservation Genetics* **5**, 827-835.

Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.

Neuwald JL, Templeton AR (2013) Genetic restoration in the eastern collared lizard under prescribed woodland burning. *Molecular Ecology* **22**, 3666-3679.

Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**, 55-65.

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.

Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* **95**, 536-539.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **155**, 945-959.

Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**, 258-275.

Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 9197-9201.

Richmond JQ, Barr KR, Backlin AR, Vandergast AG, Fisher RN (2013) Evolutionary dynamics of a rapidly receding southern range boundary in the threatened California Red-Legged Frog (Rana draytonii). *Evolutionary Applications* **6**, 808-822.

Rivera-Ortíz FA, Aguilar R, Arizmendi MDC, Quesada M, Oyama K (2014) Habitat fragmentation and genetic variability of tetrapod populations. *Animal Conservation*. doi: 10.1111/acv.12165.

Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137-138.

Rousset F (1997) Genetic Differentiation and Estimation of Gene Flow from F-Statistics Under Isolation by Distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.

Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.

Sagvik J, Uller T, Olsson M (2005) Outbreeding depression in the common frog, *Rana temporaria*. *Conservation Genetics* **6**, 205-211.

Sarasola-Puente V, Madeira M, Gosá A, Lizana M, Gómez-Moliner B (2012) Population structure and genetic diversity of *Rana dalmatina* in the Iberian Peninsula. *Conservation Genetics* **13**, 197-209.

Savage WK, Fremier AK, Bradley Shaffer H (2010) Landscape genetics of alpine Sierra Nevada salamanders reveal extreme population subdivision in space and time. *Molecular Ecology* **19**, 3301-3314.

Shepherd LD, Lambert DM (2008) Ancient DNA and conservation: lessons from the endangered kiwi of New Zealand. *Molecular Ecology* **17**, 2174-2184.

Sherman CDH, Wapstra E, Uller T, Olsson M (2008) Males with high genetic similarity to females sire more offspring in sperm competition in Peron's tree frog Litoria peronii. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**, 971-978.

Sillero N, Campos J, Bonardi A, Corti C, Creemers R, Crochet P-A, Isailovic JC, Denoël M, Ficetola GF, Gonçalves J (2014) Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia* **35**, 1-31.

Skerratt L, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald K, Phillott A, Hines H, Kenyon N (2007) Spread of Chytridiomycosis Has Caused the Rapid Global Decline and Extinction of Frogs. *EcoHealth* **4**, 125-134.

Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. In: *Ecological genetics* (ed. LA R), pp. 3-17. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Smith MA, Green DM (2005) Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* **28**, 110-128.

Spear SF, Peterson CR, Matocq MD, Storfer A (2005) Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology* **14**, 2553-2564.

Spitzen-Van Der Sluijs A, Spikmans F, Bosman W, de Zeeuw M, van der Meij T, Goverse E, Kik M, Pasmans F, Martel A (2013) Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia* **34**, 233-239.

Steinfartz S, Stemshorn K, Kuesters D, Tautz D (2006) Patterns of multiple paternity within and between annual reproduction cycles of the fire salamander

(*Salamandra salamandra*) under natural conditions. *Journal of Zoology* **268**, 1-8.

Steinfartz S, Weitere M, Tautz D (2007) Tracing the first step to speciation: ecological and genetic differentiation of a salamander population in a small forest. *Molecular Ecology* **16**, 4550-4561.

Storfer A (2003) Amphibian declines: future directions. *Diversity and Distributions* **9**, 151-163.

Storfer A, Mech S, Reudink M, Lew K (2013) Inbreeding and strong population subdivision in an endangered salamander. *Conservation Genetics*, 1-15.

Sunny A, Monroy-Vilchis O, Fajardo V, Aguilera-Reyes U (2014) Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: *Ambystoma leorae*) in Mexico. *Conservation Genetics* **15**, 49-59.

Tallmon DA, Koyuk A, Luikart G, Beaumont MA (2008) COMPUTER PROGRAMS: onesamp: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology Resources* **8**, 299-301.

Templeton AR, Shaw K, Routman E, Davis SK (1990) The genetic consequences of habitat fragmentation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**, 13-27.

Urban MC (2010) Microgeographic adaptations of spotted salamander morphological defenses in response to a predaceous salamander and beetle. *Oikos* **119**, 646-658.

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

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

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.

Veith M, Kosuch J, Vences M (2003) Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**, 310-327.

Velo-Antón G, Parra JL, Parra-Olea G, Zamudio KR (2013) Tracking climate change in a dispersal-limited species: reduced spatial and genetic connectivity in a montane salamander. *Molecular Ecology* **22**, 3261-3278.

Vences M, Wake DB (2007) Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. In: *Amphibian Biology, Vol. 6, Systematics* (eds. Heatwole HH, Tyler M), pp. 2613-2669, Chipping Norton, Australia (Surrey Beatty & Sons).

Wang IJ (2009) Fine-scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the black toad (*Bufo exsul*). *Molecular Ecology* **18**, 3847-3856.

Waples RS, Do C (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* **8**, 753-756.

Waples RS, Do C (2010) Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications* **3**, 244-262.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.

Zancolli G, Steffan-Dewenter I, Rödel M-O (2014) Amphibian diversity on the roof of Africa: unveiling the effects of habitat degradation, altitude and biogeography. *Diversity and Distributions* **20**, 297-308.

Supplementary Table 1. Characterization of the full set of 24 applied microsatellite loci for *Calotriton arnoldi*. Loci are grouped by multiplex combinations used for amplification. Locus name, primer sequence, direction (F is forward, R is reverse), annealing temperature of the primer for PCRs, microsatellite motif, amplified fragment size range, number of alleles, labeling dye, and references are provided.

Locus name	Primer sequence (5' 3')	Annealing temp. (°C)	Repeat motif of cloned allele	Size range of amplification product	Number of alleles	Fluorescence labeling	Reference
Mix1							
Calarn_02248	F: CACAACAACAGGCGAATGAC R: ACTTTAGGTCTTGCGTTGGC	59	$(TATC)_{18}$	169 209	9	FAM	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Ca3	F: CCATGCATTCTTGGAGGTTT R: TTCAAAGGCAGTGTTTCAGG	59	$(AGAT)_{15}$	233 265	9	FAM	Drechsler *et al*. 2013
Calarn_29994	F: ACCAGCTGCACTCTGCTATC R: GTGCTGCTCATCAAATAGTCAAC	59	$(TATC)_{8}$	169 185	5	VIC	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Ca21	F: AGCGTGTGCAGCAGTATCC R: GCAATGTGCCATTCATTACC	59	$(AGAT)_{12}$	232 257	7	VIC	Drechsler *et al*. 2013
Calarn_37825	F: CATCCTTGTAGCAGGCCTTTG R: CTACCAGGGGTTGATCTCAGG	59	$(AGAT)_{18}$	211 255	12	NED	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Calarn_14961	F: TTGAGAAATGCAAGGTCGCC R: GTCAGGATGACGCGTTTCG	59	$(TATC)_{11}$	201 225	7	PET	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Mix2							
Calarn_15906	F: TCAATCAAGGGCAAGATGATGAC R: ACCAATGACCTATCACAGCC	59	$(CTAT)_{14}$	105 129	7	FAM	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Calarn_12022	F: CTCTCACGGAAAAGCTCAGG R: GCGTGGCCCAATACATATTCC	59	$(TCTA)_{14}$	220 252	9	FAM	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Calarn_06881	F: AGCGCATTGCTGCCTGTG R: TACAGAGGGAGTGGGAGGAG	59	$(AGAT)_{15}$	154 190	10	VIC	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Ca7	F: ACCCTTACACACCCCAAACC R: GTTCCCTGCATGGCTCTAAA	59	$(AGAT)_{16}$	224 244	6	NED	Drechsler *et al*. 2013
Ca22	F: CTTCAGACTGCCGAGTGTTG R: ACCTTGTCACGGTGTAGGAAG	59	$(AGAT)_{13}$	126 146	6	PET	Drechsler *et al*. 2013
Calarn_50748	F: ATTGGGGTATATTGGGGCTC R: GGCATCCATCACCGATTATCTATC	59	$(AGAT)_{13}$	201 217	5	PET	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Mix3							
Ca8	F: AGAAGGGAGTCAGGCAGACA R: GGAGGATCAAATGTGTTTGGA	59	$(AGAT)_{13}$	180 204	7	FAM	Drechsler *et al*. 2013
Calarn_36791	F: TTGGAGGTGTCATCAGTGGG R: AACCACAGAAATTCACCAGTC	59	$(TCTA)_{18}$	120 148	8	VIC	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Calarn_59202	F: GTAGGTTTGGTGCGAAGTGG R: GTACGAGATCTTCTCAGTGGC	59	$(AGAT)_{15}$	212 236	7	VIC	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Ca32	F: ACAGGGCAAGAGAGTCAACG R: CAGCCTATTGGCTTGTCAGC	59	$(ACAG)_{10}$	185 197	4	NED	Drechsler *et al*. 2013
Calarn_52354	F: AAACTGTGGCATCTTGTGGC R: AGACAGCATCTGTGTCCTCTG	59	$(ATCT)_{12}$	220 240	6	PET	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Mix4							
Calarn_30143	F: AGGTTAGGTTTAGGTTTACTGCAC R: AGCTTCGTCATTCTTGTACCC	59	$(TCTG)_{7}$	186 238	9	FAM	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Calarn_31321	F: GCTTACATCCATCCTTCTCGTC R: AGGCAGATGTTTTGATGGGTG	59	$(ATCT)_{19}$	148 193	10	VIC	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Calarn_15136	F: GCTAGTTTGCTTTGGCAGTTC R: CTGCCTTTTGGCTAGGTTCG	59	$(TGTA)_{15}$	165 177	4	NED	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Mix5							
Calarn_37884	F: GGGGCGCAAGTTACAGTTAG R: ATGTAGTGTGGCAGGTGAGG	59	$(ATAG)_{10}$	240 267	7	FAM	Valbuena-Ureña *et al.* 2014
Us2	F: TGGGCTGAAGGATTGAAAAA R: CTCAGCTGCAGTGGTGTGTT	59	$(AGAT)_{17}$	219 239	6	VIC	Drechsler *et al*. 2013
Us3	F: AAGTTTGTAGGTATGCATAATAGCC R: GGAAGTCCAGGCCTGTAGAC	59	$(AGAT)_{16}$	143 167	5	NED	Drechsler *et al*. 2013
Us7	F: CTGCACCGATTAATTGCAGA R: CTGCACCACTCGCTCCTC	59	$(ACAT)_{16}$	222 246	5	PET	Drechsler *et al*. 2013

Supplementary Table 2a. Estimates of genetic parameters for each eastern population and locus. N, sample size; A, number of alleles per locus; Ar, allelic richness; PA, number of private alleles; PAAr, allelic richness of private alleles; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; F_{IS}, inbreeding coefficient

Population	Locus	Calarn 02248	Ca3	Calarn 29994	Ca21	Calarn 37825	Calarn 14961	Calarn 15906	Calarn 12022	Calarn 06881	Ca7	Ca22	Calarn 50748	CA8	Calarn 36791	Calarn 59202	Ca32	Calarn 52354	Calarn 30143	Calarn 31321	Calarn 15136	Calarn 37884	US2	Us3	Us7	Overall
A1	N	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000	23.000
	A	6.000	3.000	2.000	2.000	8.000	4.000	4.000	5.000	4.000	4.000	2.000	4.000	4.000	5.000	4.000	4.000	4.000	5.000	6.000	4.000	5.000	4.000	4.000	3.000	4.167
	Ar	6.000	3.000	2.000	2.000	8.000	4.000	4.000	5.000	4.000	4.000	2.000	4.000	4.000	5.000	4.000	4.000	4.000	5.000	6.000	4.000	5.000	4.000	4.000	3.000	4.167
	PA	2.000	-	1.000	-	1.000	-	-	-	-	-	1.000	-	-	-	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	7.000
	PAAr	2.148	0.000	1.000	0.000	1.002	0.000	0.000	0.004	0.012	0.000	1.000	0.148	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	1.148	0.311
	H_O	0.739	0.522	0.087	0.304	0.870	0.609	0.913	0.391	0.391	0.652	0.043	0.565	0.391	0.826	0.478	0.435	0.565	0.609	0.652	0.478	1.000	0.826	0.565	0.174	0.545
	H_E	0.642	0.614	0.162	0.372	0.814	0.649	0.702	0.430	0.490	0.724	0.043	0.579	0.380	0.729	0.411	0.509	0.467	0.690	0.757	0.506	0.710	0.623	0.530	0.382	0.538
	F_{IS}	-0.156	0.154	0.470	0.185	-0.071	0.064	-0.309	0.092	0.205	0.101	0.000	0.024	-0.031	-0.136	-0.169	0.149	-0.217	0.120	0.142	0.057	-0.421	-0.335	-0.067	0.550	0.017
	F_{IS} P- value	0.169	0.219	0.125	0.359	0.334	0.407	0.019	0.373	0.122	0.272	1.000	0.549	0.632	0.202	0.202	0.235	0.095	0.251	0.145	0.444	0.001	0.029	0.434	0.006	0.709
A2	N	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000
	A	4.000	5.000	2.000	4.000	5.000	6.000	5.000	4.000	4.000	3.000	2.000	3.000	4.000	6.000	2.000	3.000	5.000	5.000	6.000	3.000	5.000	5.000	3.000	3.000	4.042
	Ar	3.852	4.852	1.852	4.000	4.980	5.684	5.000	3.961	4.000	2.998	2.000	2.850	3.852	5.849	2.000	3.000	4.959	4.852	5.849	3.000	4.850	4.852	2.980	2.832	3.954
	PA		1.000	-	1.000	-	-	1.000		2.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.000
	PAAr	0.000	1.000	0.000	1.148	0.000	0.000	1.000	0.000	2.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.214
	H_O	0.667	0.667	0.037	0.667	0.630	0.741	0.815	0.407	0.741	0.593	0.296	0.148	0.556	0.667	0.407	0.667	0.630	0.593	0.593	0.259	0.741	0.741	0.259	0.111	0.526
	H_E	0.543	0.719	0.037	0.651	0.674	0.719	0.790	0.495	0.716	0.560	0.257	0.142	0.514	0.633	0.484	0.604	0.518	0.565	0.615	0.297	0.643	0.722	0.388	0.108	0.516
	F_{IS}	-0.233	0.074	0.000	-0.025	0.067	-0.031	-0.032	0.179	-0.035	-0.060	-0.156	-0.045	-0.083	-0.054	0.161	-0.106	-0.221	-0.049	0.037	0.129	-0.156	-0.027	0.336	-0.026	-0.015
	F_{IS} P- value	0.087	0.338	1.000	0.521	0.377	0.489	0.494	0.168	0.490	0.435	0.551	0.892	0.392	0.435	0.341	0.316	0.073	0.457	0.473	0.315	0.150	0.510	0.055	0.942	0.266
A3	N	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000
	A	3.000	4.000	2.000	4.000	6.000	7.000	3.000	9.000	4.000	3.000	3.000	5.000	6.000	5.000	4.000	3.000	5.000	6.000	5.000	2.000	4.000	4.000	4.000	2.000	4.292
	Ar	3.000	3.852	1.852	3.852	5.980	6.956	2.852	8.978	3.852	2.852	2.980	4.850	5.852	4.980	3.998	3.000	4.830	5.850	4.998	2.000	3.980	3.980	3.998	2.000	4.222
	PA	-	-	-	-	-	-	-	2.000	-	-	-	-	-	1.000	1.000	-	1.000	-	-	-	-	-	-	-	5.000
	PAAr	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	1.998	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.998	0.000	0.998	0.148	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.215
	H_O	0.444	0.593	0.037	0.704	0.889	0.593	0.370	0.815	0.407	0.222	0.556	0.741	0.704	0.778	0.519	0.630	0.481	0.815	0.704	0.185	0.741	0.444	0.556	0.519	0.560
	H_E	0.616	0.579	0.037	0.670	0.797	0.680	0.314	0.879	0.514	0.262	0.544	0.651	0.732	0.737	0.481	0.486	0.586	0.785	0.707	0.171	0.638	0.495	0.593	0.453	0.559
	F_{IS}	0.282	-0.023	0.000	-0.051	-0.117	0.131	-0.185	0.074	0.210	0.154	-0.021	-0.142	0.039	-0.056	-0.079	-0.304	0.182	-0.039	0.005	-0.083	-0.165	0.105	0.064	-0.148	-0.007
	F_{IS} P- value	0.037	0.528	1.000	0.447	0.150	0.163	0.358	0.215	0.103	0.357	0.522	0.177	0.741	0.407	0.405	0.027	0.154	0.467	0.555	0.820	0.165	0.281	0.401	0.362	0.482

Supplementary Table 2b. Estimates of genetic parameters for each western population and locus. N, sample size; A, number of alleles per locus; Ar, allelic richness; PA, number of private alleles; PAAr, allelic richness of private alleles; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; F_{IS}, inbreeding coefficient

Population	Locus	Calarn 02248	Ca3	Calarn 29994	Ca21	Calarn 37825	Calarn 14961	Calarn 15906	Calarn 12022	Calarn 06881	Ca7	Ca22	Calarn 50748	CA8	Calarn 36791	Calarn 59202	Ca32	Calarn 52354	Calarn 30143	Calarn 31321	Calarn 15136	Calarn 37884	US2	Us3	Us7	Overall
B1	N	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000
	A	3.000	4.000	2.000	3.000	8.000	5.000	3.000	4.000	6.000	4.000	4.000	3.000	3.000	3.000	4.000	2.000	3.000	4.000	4.000	4.000	3.000	4.000	1.000	1.000	3.542
	Ar	3.000	4.000	2.000	2.995	7.755	4.910	3.000	4.000	5.840	3.915	3.840	3.000	2.920	3.000	3.920	2.000	3.000	3.995	4.000	3.920	3.000	4.000	1.000	1.000	3.500
	PA	-	-	-	-	-	-	1.000	-	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	-	-	-	-	-	3.000
	PAAr	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	1.000	0.000	0.920	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	1.178	0.000	0.179	0.000	0.000	0.000	0.137
	H_O	0.240	0.600	0.560	0.480	0.720	0.760	0.320	0.720	0.680	0.600	0.280	0.440	0.240	0.480	0.560	0.280	0.600	0.440	0.600	0.520	0.560	0.520	0.000	0.000	0.467
	H_E	0.223	0.589	0.509	0.467	0.793	0.602	0.344	0.638	0.602	0.533	0.520	0.631	0.220	0.427	0.691	0.301	0.613	0.523	0.569	0.479	0.448	0.533	0.000	0.000	0.469
	F_{IS}	-0.079	-0.020	-0.102	-0.029	0.093	-0.270	0.070	-0.132	-0.132	-0.129	0.467	0.307	-0.095	-0.127	0.193	0.072	0.022	0.162	-0.056	-0.087	-0.256	0.025	-	-	-0.005
	F_{IS} P- value	0.727	0.560	0.449	0.569	0.252	0.066	0.457	0.217	0.216	0.305	0.009	0.036	0.705	0.318	0.116	0.580	0.519	0.188	0.445	0.398	0.074	0.521	-	-	0.585
B2	N	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	27.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	27.958
	A	3.000	4.000	4.000	2.000	5.000	4.000	1.000	3.000	4.000	3.000	4.000	3.000	2.000	2.000	3.000	2.000	3.000	3.000	2.000	2.000	3.000	6.000	1.000	1.000	2.917
	Ar	2.971	3.996	3.966	2.000	4.999	3.792	1.000	2.821	3.999	3.000	3.998	3.000	1.821	2.000	3.000	1.821	3.000	2.999	1.821	2.000	2.821	5.817	1.000	1.000	2.860
	PA	-	-	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	-	-	-	-	-	-	2.000
	PAAr	0.000	0.000	1.000	0.000	0.080	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.999	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.087
	H_O	0.214	0.571	0.357	0.464	0.679	0.607	0.000	0.429	0.571	0.464	0.407	0.821	0.036	0.250	0.357	0.036	0.714	0.607	0.036	0.143	0.464	0.679	0.000	0.000	0.371
	H_E	0.257	0.610	0.393	0.493	0.711	0.524	0.000	0.527	0.646	0.451	0.572	0.646	0.036	0.223	0.389	0.036	0.634	0.571	0.036	0.249	0.371	0.742	0.000	0.000	0.380
	F_{IS}	0.169	0.064	0.092	0.059	0.046	-0.162	-	0.189	0.117	-0.029	0.292	-0.278	0.000	-0.125	0.083	0.000	-0.130	-0.064	0.000	0.432	-0.258	0.087	-	-	0.028
	F_{IS} P- value	0.293	0.383	0.330	0.538	0.415	0.222	-	0.194	0.250	0.536	0.026	0.032	1.000	0.645	0.357	1.000	0.240	0.440	1.000	0.076	0.166	0.269	-	-	0.240
B3	N	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	25.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	26.000	25.958
	A	2.000	2.000	1.000	3.000	4.000	2.000	2.000	3.000	1.000	2.000	2.000	2.000	2.000	1.000	2.000	2.000	1.000	2.000	1.000	1.000	2.000	1.000	1.000	1.000	1.792
	Ar	2.000	1.885	1.000	2.885	4.000	1.885	1.885	3.000	1.000	2.000	2.000	2.000	2.000	1.000	1.885	2.000	1.000	2.000	1.000	1.000	2.000	1.000	1.000	1.000	1.768
	PA	-	-	-	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.000
	PAAr	0.000	0.000	0.000	0.885	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.079
	H_O	0.654	0.038	-	0.538	0.731	0.038	0.038	0.769	0.000	0.462	0.520	0.654	0.154	0.000	0.038	0.192	0.000	0.154	0.000	0.000	0.308	0.000	0.000	0.000	0.230
	H_E	0.491	0.038	-	0.429	0.661	0.038	0.038	0.673	0.000	0.510	0.393	0.491	0.145	0.000	0.038	0.177	0.000	0.145	0.000	0.000	0.265	0.000	0.000	0.000	0.197
	F_{IS}	-0.341	0.000	-	-0.261	-0.107	0.000	0.000	-0.145	-	0.096	-0.333	-0.341	-0.064	-	0.000	-0.087	-	-0.064	-	-	-0.163	-	-	-	-0.121
	F_{IS} P- value	0.083	1.000	-	0.088	0.263	1.000	1.000	0.209	-	0.466	0.118	0.087	0.877	-	1.000	0.805	-	0.886	-	-	0.531	-	-	-	0.001
B4	N	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000
	A	2.000	3.000	3.000	2.000	4.000	3.000	1.000	3.000	4.000	3.000	2.000	3.000	2.000	2.000	2.000	1.000	2.000	2.000	2.000	3.000	2.000	3.000	1.000	1.000	2.333
	Ar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.000
	PAAr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H_O	0.750	0.500	1.000	0.250	0.750	0.750	0.000	0.750	0.500	0.750	0.750	0.500	0.250	0.250	0.250	0.000	0.500	0.250	0.250	1.000	0.250	0.250	0.000	0.000	0.438
	H_E	0.536	0.679	0.679	0.250	0.750	0.607	0.000	0.607	0.750	0.607	0.536	0.679	0.536	0.536	0.250	0.000	0.429	0.250	0.250	0.750	0.250	0.464	0.000	0.000	0.433
	F_{IS}	-0.500	0.294	-0.600	0.000	0.000	-0.286	-	-0.286	0.368	-0.286	-0.500	0.294	0.571	0.571	0.000	-	-0.200	0.000	0.000	-0.412	0.000	0.500	-	-	-0.023
	F_{IS} P- value	0.580	0.432	0.243	1.000	1.000	0.579	-	0.571	0.210	0.566	0.577	0.439	0.441	0.421	1.000	-	0.861	1.000	1.000	0.343	1.000	0.141	-	-	0.507

Supplementary Table 3. Values used in isolation by distance (IBD) analysis. Measure of genetic differentiation F_{ST} /(1- F_{ST}), below the diagonal; logarithmic geographic distances in km, above the diagonal.

F_{ST}/(1-F_{ST}) / Ln (dist)	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4
A1	-	1,12914149	1,49357803	3,61005267	3,58482364	3,61552889	3,6221786
A2	0,09349371	-	1,33500107	3,59223088	3,56654231	3,59780529	3,60457351
A3	0,17730162	0,21684108	-	3,59035662	3,56461924	3,59594146	3,60272226
B1	0,84060372	0,89861401	0,79629962	-	0,86919912	0,577175	0,70754306
B2	1,03748981	1,10260723	0,96270854	0,10619469	-	0,95088538	1,04239461
B3	1,58866166	1,60824204	1,49314385	0,5051174	0,59159637	-	0,57210885
B4	0,79468772	0,85116623	0,72176309	0,12233446	0,16890707	0,95465207	-

Supplementary Table 4. Recent migration rate estimations between *Calotriton arnoldi* populations within eastern and western sectors.

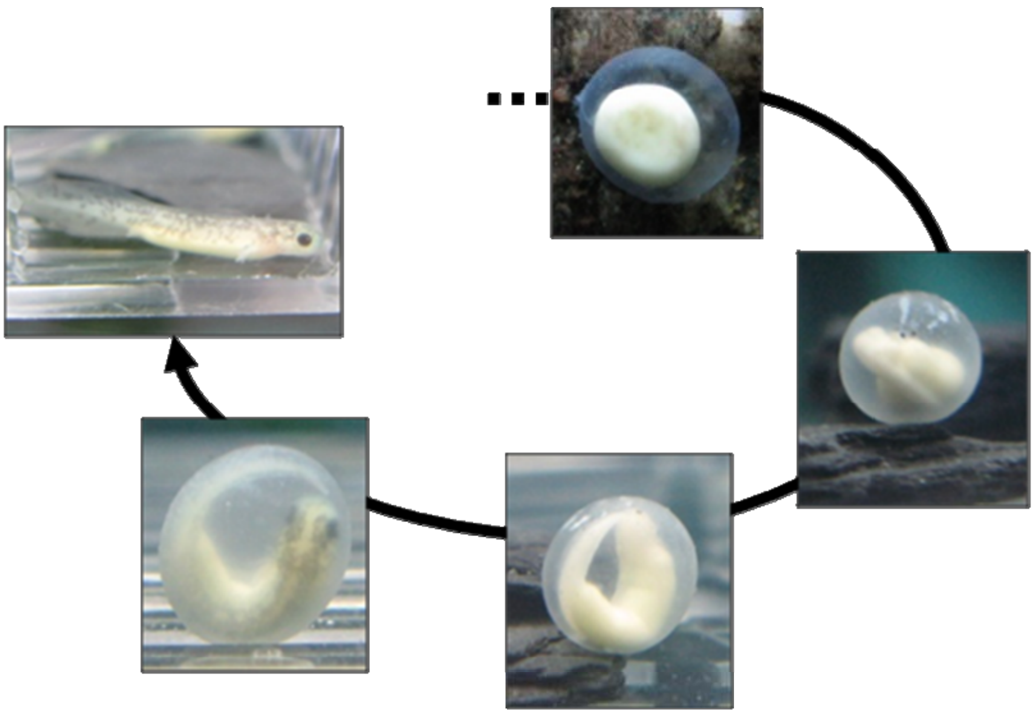
Eastern

	A1	A2	A3
A1	0,99868 (0,00518)	0,00068 (0,00314)	0,00064 (0,00289)
A2	0,00063 (0,00303)	0,99880 (0,00486)	0,00057 (0,00260)
A3	0,00077 (0,00339)	0,00066 (0,00283)	0,99857 (0,00535)

Western

	B1	B2	B3	B4
B1	1 (0,05838)	0,00105 (0,08827)	0,00204 (0,14776)	0,00157 (0,09339)
B2	0,00020 (0,00088)	1 (0,03856)	0,00020 (0,00038)	0,00021 (0,00091)
B3	0,00160 (0,08970)	0,00181 (0,06574)	1 (0,20118)	0,00187 (0,03317)
B4	0,00081 (0,01540)	0,00095 (0,01771)	0,00092 (0,01224)	1 (0,03283)

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



CAPÍTOL VII

Evaluating the ex situ conservation project of the critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*): are we going in the right direction?

Valbuena-Ureña E[1,2], Soler-Membrives A[1], Steinfartz S[3], Alonso M[2], Carbonell F[2], Larios R[2], Obon E[2], Carranza S[4]

[1]Unitat de Zoologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Catalonia, Spain

[2]Centre de Fauna Salvatge de Torreferrussa (Catalan Wildlife Service – Forestal Catalana). Finca de Torreferrusa, Crta B-140, Km 4,5. 08130, Santa Perpètua de la Mogoda, Barcelona, Catalonia, Spain

[3]Zoological Institute, Department of Evolutionary Biology, Technische Universität Braunschweig, Mendelssohnstr. 4, 38106 Braunschweig, Germany

[4]Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

Corresponding author

Valbuena-Ureña E: emiliojavier.valbuena@uab.cat

Keywords

Calotriton arnoldi, captive breeding program, ex situ management, founders, genetic diversity, inbreeding, effective population size

Abstract

Ex situ management strategies play an important role for the conservation of threatened and endangered species. Two main objectives should be priority when planning breeding programs: the maintenance of the maximum neutral genetic diversity, and to obtain "self-sustaining" captive populations. In this study, we evaluate the genetic quality of the captive breeding stock of the Montseny brook newt, *Calotriton arnoldi*. This critically endangered species is geographically, morphologically and genetically differentiated into two disconnected sectors (eastern and western) in the wild. We test if the level of genetic diversity (allelic diversity and heterozigosity) detected in the two current captive breeding lines is comparable to that observed in the wild. Relatedness and the estimation of captive effective population sizes (N_e) are also evaluated to infer if the actual captive genetic diversity is sufficient for its endurance over time. The results show that the captive stock has retained 82% of the alleles present in the wild populations, and estimates of H_E of the captive stock were generally lower than their wild counterparts, though more evident in the eastern sector. Moreover, the genetic differentiation values between the captive and wild populations were around 5-7%. In agreement with standard conservation guidelines, we conclude that the genetic diversity in the captive stock is good but not optimal. New genetic material should be incorporated by introducing new unrelated individuals or their sperm. We suggest maintaining two distinct breeding lines, and we do not recommend crossing between them. Low N_e values were estimated (around 18-39) and not all founders were fully unrelated as assumed in a captive breeding program. These facts raise the possibility of inbreeding depression, and fail the goal of maintaining the 90% of the initial genetic variation within a long-term period. Therefore, we suggest implementing an open system that allows the continuous gene flow from in situ to captive populations. Captive stock and subsequent cohorts should be long-term monitored in order to preserve genetic variation.

Introduction

Many scientists agree that we are achieving the midst of the sixth great mass extinction. Anthropogenic pressure is affecting both directly or indirectly natural environments (Wake and Vredenburg 2008). The amphibians are one of the most severely affected groups, and are the only ones catalogued globally at risk. Therefore, currently and within the near future, the application of ex situ breeding attempts might become very important (Griffiths and Pavajeau 2008). The development of well-designed captive populations can be crucial for species recovery and management of threatened or endangered species with wild populations declining precipitously (Ralls and Ballou 1986; Frankham 1995). Lacy (2009) reported the difference between a well-designed and a non-designed captive breeding program with two bovid mammals (arabian oryx and markhor) concluding a very different future for them. The number of initial founders and their correct selection will be key factors worth considering.

Genetic diversity present in a captive population is determined by its founders (Mace et al. 1992). Captive populations often present small sizes due to spatial or financial limitations of the organizations that manage them. Moreover, captive populations are frequently created when the species at risk has dwindled to small numbers in the wild (Conde et al. 2011; Lyles and May 1987; Traylor-Holzer 2011; Williams and Hoffman 2009). For these reasons, individuals may represent only a small fraction of the genetic diversity of the wild population (Ballou and Lacy 1995; Mace 1986; Ralls and Ballou 1992) and therefore, limited genetic diversity may be present among ex situ founders. The number of founders, and their relatedness to each other, determines the amount of genetic diversity that can be retained in the captive population (Frankham et al. 2010; Mace et al. 1992; Senner 1980; Willis and Willis 2010). Loss of genetic variation may be a serious threat to its long-term viability in such populations (Lacy 1997; Willis 1993). Captive populations may encounter distinct types of genetic change similar to small closed populations, such as the loss genetic diversity and the accumulation of new mildly deleterious alleles which could drive into inbreeding depression. Moreover, genetic adaptation to captivity should be also considered when managing populations ex situ (Ballou and Lacy 1995; Frankham 1995; Frankham 2008; Princée 1995).

Carefully planned breeding programs are therefore required to minimize these threads. Two main aspects are important to be considered for the creation of a well-designed program. On the one hand, there is broad agreement among wildlife management officials that the retention of 97.5% of the genetic diversity from wild populations should be a sufficient goal for the long-term viability of founder populations (Edwards et al. 2014). On the other hand, it is estimated that a "self-sustaining" ex situ population must keep up to 90% of the founding population's genetic variability for the time of the ex situ program duration, equivalent to the time required for habitat recovery (Soulé et al. 1986; Ballou et al. 2006). Therefore, the capture of the maximum genetic diversity from wild and its conservation for a long-time period are the two main goals of ex situ breeding programs. However, in some cases these values cannot be achieved due to the realistic situation in the wild. In these cases, an accurately design should be planned to ensure the conservation of the highest amount of genetic diversity.

Genetic diversity is measured in terms of allelic diversity and heterozigosity (Ballou and Foose 1996; Ballou et al. 2010). Allelic diversity may represent the evolutionary potential of a population and plays an important role in the process of adaptation to to environmental change; it is, therefore, an important value to consider for a population's long-term ability (Ballou et al. 2010; Briscoe et al. 1992; Frankham 2003; Princée 1995). Allelic diversity may be affected by population bottlenecks, such as those which may arise as a result of the creation of breeding stock (Amos and Balmford 2001). Heterozygosity is described either as observed or expected heterozigosity. The former is defined by the proportion of genetic loci for which the average individual in a population is heterozygous; the latter is referred to the probability that two homologous genes randomly drawn from the population are distinct alleles (Höglund 2009; Lacy 1994), i.e. the mean heterozigosity that would exist in a population if it were in Hardy-Weinberg equilibrium. Therefore, the measurement of the heterozigosity may be an indicator of individual health and its capability to response to selection (Lacy 1994; Reed and Frankham 2003).

To sum up, the number of founders that started a breeding program should be a balance between genetic diversity captured from the wild and its sustainability, and the number of individuals to be extracted from the wild population without compromising them, as well as the capability of maintaining these numbers of breeders and descendants.

The Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) is one of the most endangered vertebrates in Europe and it is classified as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) (Carranza and Martínez-Solano 2009). The current distribution range is limited to an area of only 8 km^2 in the Montseny Natural Park, NE Iberian Peninsula. Furthermore, their disconnected populations are found in seven geographically close brooks, fragmented into two main sectors (eastern and western) on both sides of the Tordera river valley and separated by unsuitable habitat (Valbuena-Ureña et al. 2013 – Chapter IV). With an estimated population size of less than 1500 mature individuals (Amat and Carranza 2005), the major threats affecting this species is habitat degradation and disturbance, such as large amounts of water extracted for commercial purposes, deforestation and the existence of tracks and roads that disrupt the brook continuity (Amat et al. 2014).

Contrary to what was expected, the previous genetic study focused on *C. arnoldi* concluded that genetic diversity in this species is comparable to populations of amphibian species with much larger distribution ranges (Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI). This study asserted that natural habitat fragmentation stated above has not produced a negative effect on this species on an evolutionary time scale, and strongly suggested both sectors should be considered as separate management units for conservation. The strong population structure detected in this species, together with the low Ne estimated supported the current status catalogued by the IUCN.

Although the conservation plan is not yet approved for this species, as a consequence of its fragile status, some in situ management measures have been developed by the Barcelona Provincial Council, such as habitat restoration and field monitoring (Amat et al. 2014). Moreover, the Catalonian Government established in 2007 a captive breeding program for purposes of maintenance of representative refugee populations as well as for research and re-introduction or reinforcement of the wild populations (DAAM in progress). In order to maintain the maximum genetic diversity, the IUCN recommends in its guidelines to start a captive breeding program when a species still numbers in thousands in the wild. Considering the low numbers of individuals estimated for this species, was fully justified the need for a captive breeding program for this species, and it became evident the urgency to start immediately with the breeding program. Individuals from eastern A1, and western B1 and B2 wild populations were sampled randomly ensuring a good body condition, pending detailed genetic results. These founders from each sector were kept separately as two distinct breeding lines, as a result of preliminary data on the genetic and morphological variability between the two sectors (Carranza and Amat 2005) that has been corroborated in posterior studies (Valbuena-Ureña et al. 2013 – Chapter IV; Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI). Since its beginning in 2007 and after seven years operating, this program has successfully reared more than 1500 individuals (Carbonell et al. 2014). Though demonstrating the viability of the breeding program, no analyses have yet been performed to determine the levels of genetic diversity among captive individuals. Taking into account the vulnerability of the species – i.e. the low number of individuals present, the fragmentation into two sectors and the peculiar genetic characteristics in their natural environment (Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI) – the correct design of the captive breeding stock will be crucial for ensuring its long-term viability. Moreover, this program offers an excellent opportunity for evaluating its utility by studying the selection and quantifying the founders needed and to state recommendations for similar species.

The aim of this study is to evaluate the genetic quality present in the captive stock of Montseny brook newts using 24 microsatellite loci. These will be assessed by evaluating if the level of genetic diversity (allelic diversity and heterozigosity) observed in the captive stock is comparable to that observed in the wild. Moreover, it is also evaluated if the actual captive gene diversity is sufficient for its endurance over time. For this aim the relatedness among individuals and the estimation of captive effective population sizes will be assessed. Recommendations suggested from these results are crucial to ensure the genetic quality of the breeding members and thus will help to successfully establish a "self-sustaining" captive population, and therefore the long-term endurance of the ex situ conservation program.

Materials and methods

Sample collection and genotyping

A total of 42 individuals (founders and descendents) from the captive breeding facility were analyzed, including samples from both breeding lines. All founders from the eastern sector belonged to population A1, and founders from the western captive breeding line were from populations B1 and B2 (see Valbuena-Ureña et al. (2013) – Chapter IV, for population codification). The samples contained 9 out of the 13 eastern founders and 10 out of the 11 western founders, which represented 79% of the 24 initial founders. Nine of them were female while 10 were male. Only 5 founders (4 from the eastern and 1 from western breeding lines) could not be sampled because they died before sampling. The remaining 23 samples correspond to F1 descendents, 17 from the eastern breeding line and 6 from the western one. In total, 26 captive individuals from the eastern breeding line were analyzed and compared to 77 genotyped wild animals from this sector and 16 captive individuals from the western breeding line were genotyped and compared to 83 wild animals from the western sector (see Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI) for information about the genotyping of the wild populations). Tissue samples consisted of tail tips or fingers preserved in absolute ethanol. Genomic DNA was extracted using QiagenTM (Valencia, California) DNeasy Blood and Tissue Kit following the manufacturer's protocol. All 42 individuals' arrays were genotyped for 24 polymorphic microsatellite loci, as described previously (Drechsler et al. 2013; Valbuena-Ureña et al. 2014 – Chapter V). Details of the PCR-multiplex combinations of loci and specific amplification procedures are given in Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI.

Data analysis

The MICRO-CHECKER software (Van Oosterhout et al. 2004) was used to check for potential scoring errors, large allele dropout and the presence of null alleles. Pairwise linkage disequilibrium between loci was checked using the software GENEPOP version 4.2.1 (Rousset 2008). The same program was used to calculate deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in each grouping and for each locus, which provides an exact probability value (Guo and Thompson 1992). Genetic diversity was measured for each grouping as mean number of alleles (A), observed (H_O) and expected heterozygosity (H_E) using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995). Formal analyses of raw allelic richness values were not performed because the number of alleles detected at a locus can be influenced by sample sizes. Therefore a rarefied estimate of allelic richness (Ar) was obtained with HP-RARE (Kalinowski 2005). The nonparametric Wilcoxon signed-rank tests (Wilcoxon 1945) was used to test for differences in diversity levels between captive and wild groups using locus-specific values of H_E or allelic richness as paired replicates. In analyses based on allelic richness, separate rarefactions were performed for each sector groupings to account for the smallest sample size from a particular group. The observed number of private alleles (PA), defined here as alleles found in a single population throughout the study region, for each locus and each grouping was calculated with GDA (Lewis and Zaykin 2000) and the ratio of presence compared to wild PA was computed. Moreover, overall and intrapopulation subdivision coefficients (F_{IS}) for all markers and groupings were calculated using the same program as above, which calculates the estimator f of Weir and Cockerham (1984) for each marker as well as a multilocus estimate. Genetic differentiation between the captive and wild population was derived from the F_{ST} values obtained in ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer 2010).

A Bayesian clustering algorithm using the program STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) was used not only to analyze the structure of the captive stock comparing it to the wild populations but also to confirm the origin of founders and to corroborate the assignment of their descendants. The software assigns individuals to clusters without using prior information on their localities of origin. The admixture model with correlated allele frequencies was assumed using a "burn in" period of 100000 iterations followed by one million Markov chain Monte Carlo (MCMC) iterations. Number of cluster (K) values evaluated ranged from one (panmixia) to eight (the number of sample locations plus one), and 10 runs for each K value were performed. The inference for the best value of K was based on the ΔK method described by Evanno et al. (2005) implemented in STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012). The program uses a Markov chain Monte Carlo (MCMC) procedure to estimate $P(X|K)$, the posterior probability that the data fit the hypothesis of K clusters. The program also calculates the fractional membership of each individual in each cluster (Q). The probability that a certain individual comes from a particular population was calculated using Bayesian criteria in GENECLASS 2.0 (Piry et al. 2004). Assignment probabilities are computed based on a Monte Carlo resampling method (Paetkau et al. 2004). A total number of 10000 individuals were simulated and a threshold of 0.001 was used.

In order to test the levels of endogamy, the relatedness among individuals within each grouping was evaluated using MLRELATE (Kalinowski et al. 2006). This program is appropriate as it is designed for microsatellites, is based on maximum likelihood tests, and considers null alleles. Furthermore, GenAlEx v. 6 (Peakall and Smouse 2006) was used to obtain pairwise relatedness among individuals in each population using the r_{qg} estimator (Queller and Goodnight 1989).

The effective population size (N_e) for each breeding line based on one-sample N_e estimator method was calculated with ONeSAMP (Tallmon et al. 2008). ONeSAMP employs approximate Bayesian computation. The analyses were submitted online to the ONeSAMP 1.2 server (http://genomics.jun.alaska.edu/asp/Default.aspx), specifying a minimum N_e value of 2 and a maximum of 100.

To detect evidence for recent episodes of bottlenecks we tested for significant heterozygosity excess or deficit with the program BOTTLENECK, version 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996). This approach is effective for detecting bottlenecks that have occurred recently, within the past 0.2-4.0N_e generations (Luikart and Cornuet 1998). The infinite allele (IAM), stepwise mutation (SMM), and two-phase mixed (TPM) models were tested; the latter with the assumption that microsatellites follow a 95% stepwise-mutation model with a variance of 12.00, following the recommendations of Piry et al. (1999). To test whether a population contained a significant number of loci with heterozygosity excess, the Wilcoxon signed rank test with 2000 iterations was used. Second, a mode shift test was used to detect distortion of the L-shape expected under equilibrium for the frequency distribution of allele classes for each of the captive breeding lines (Luikart et al. 1998).

Results

A total of 140 alleles were identified for the 24 microsatellite loci in the 42 individuals of the captive stock analyzed (19 founders and 23 descendents), compared to the 170 alleles found in the 160 specimens analyzed from the wild populations. Regarding the presence of alleles by sector, 98 alleles were detected in the eastern captive breeding line in contrast to the 132 observed in the wild, and 74 alleles were detected in the western captive breeding line in contrast to the 95 observed in the wild. Like in the wild populations, all 24 microsatellites were polymorphic for the eastern captive breeding line but Us3 and Us7 were monomorphic throughout the western captive population (Suppl. Table 1). No evidence of null alleles was detected except for Ca8 from the eastern sector. No significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were found in the captive breeding lines after applying Bonferroni correction (P>0.00104). Only one locus (Calarn 52354) in the eastern captive population deviated from HWE. There was no sign of linkage disequilibrium between any pair of loci except between Ca07 and Calarn52354 in the eastern captive group after applying a Bonferroni correction (P>0.00018).

The genetic diversity measures are shown in Table 1. Similar values of mean number of alleles (A) are found in the captive and wild individuals from the eastern sector, while captive individuals from the western sector showed slightly higher values of A than wild specimens. Regarding differences among groups taking into account sample size, rarefied allelic richness was lower in the eastern captive individuals than in the wild ones, though the difference was not significant, and allelic richness was similar between western captive and wild individuals. Generally, higher allelic richness values were observed in the eastern captive and wild groups compared to the western ones. Also similar values were found among founders and descendants. The number of alleles per locus ranged from one to a maximum of seven (Suppl. Table 1). Each breeding line was found to contain private alleles (PA) that are only present in a single sector. A total of 57 PA were found in the eastern captive individuals (two of them not found before in the wild) compared to 75 present in wild samples (i.e. the 76% of the PA are present in captivity). Thirty-one PA were found in the western captive samples out of 38 found in wild individuals (81.5%). One allele found in the eastern line captive population was considered a PA from the wild populations of the western sector, and vice versa (one captive western allele considered a wild PA from the eastern sector). Regarding F1, 11 and 2 new PA were found in the eastern and western sectors, respectively.

Table 1. Genetic diversities of the captive breeding lines compared to wild population sectors of the Montseny brook newt. Values represent averages across 24 loci. N, sample size; A, number of alleles per locus; Ar, allelic richness; PA, number of private alleles; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; F_{IS}, inbreeding coefficient. Values in bold indicate statistical significance after Bonferroni correction.

Group	N	A	Ar	PA	H_O	H_E	F_{IS}
Eastern							
Founders	9	3,417	3,420	46	0,574	0,501	-0,088
F1	17	3,750	3,330	55	0,522	0,513	0,012
Total captive	26	4,083	3,380	57	0,540	0,519	-0,022
Wild	77	4,167	4,112	75	0,544	0,538	**0,090**
Western							
Founders	10	2,917	2,650	28	0,413	0,421	0,072
F1	6	2,458	2,460	24	0,507	0,387	-0,227
Total captive	16	3,083	2,590	30	0,448	0,418	-0,039
Wild	83	2,724	2,610	38	0,359	0,352*	**0,184**

* H_E = 0.423 when population B3 is excluded from wild analysis (Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI).

The mean expected heterozygosities (H_E) were 0.519 and 0.418 in the eastern and western captive breeding lines respectively. On a locus by locus basis, H_E of the captive eastern line was significantly lower than their wild counterparts (p = 0.0082). No differences were observed in the west between captive and wild western individuals, although a tendency towards smaller average heterozygosity was observed in the wild populations. Overall, F_{IS} did not show values significantly different from zero in each breeding line after applying Bonferroni correction. The F_{ST} between the captive and wild populations was 0.061 ($p<0.001$) for the eastern sector and 0.044 ($p<0.01$) for the western sector.

Captive and wild allele frequencies are given in Suppl. Table 2. Regarding the eastern sector, all but three of the alleles found in the captive sample were present in the wild sample, whereas 37 alleles found in the wild sample were not found in the captive stock. Instead, in the western sector only one allele found in captivity was not present in the wild, while 22 alleles present in the wild specimens were not found in the captive stock.

Genetic structure and population assignments

Calculation of ΔK from the structure output of the captive stock produced a modal value of the statistic at K = 2. All runs at K = 2 produced identical clustering solutions with similar values of cluster membership Q for all individuals within sectors (Table 2).

Table 2. Performance of the exclusion simulation test (GENECLASS) and Bayesian assignment test (STRUCTURE) used to assign individuals to a population of origin.

Sample	Geographic origin	STRUCTURE Q (E/W clusters; K=2)	GENECLASS locality of highest probability assignment-exclusion test	GENECLASS highest assignment probability
SPM10032701	Eastern-A1	0,902/0,098	Eastern-A1	0,091
SPM12030501	Eastern-A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,531
SPM12030502	Eastern-A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,683
SPM12030503	Eastern-A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,312
SPM12030504	Eastern-A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,710
SPM12030505	Eastern-A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,925
SPM12030506	Eastern-A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,185
SPM12030507	Eastern-A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,428
SPM12030508	Eastern-A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,794
SPM12050801	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,202
SPM12050802	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,566
SPM12050803	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,488
SPM12050804	Captive F1 - A1	0,998/0,002	Eastern-A1	0,152
SPM12050805	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,338
SPM12050806	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,285
SPM12050807	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,076
SPM12050808	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,103
SPM12050809	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,157
SPM12050810	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,123
SPM12050811	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,040
SPM12050812	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,227
SPM12050813	Captive F1 - A1	0,998/0,002	Eastern-A1	0,228
SPM12050814	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,154
SPM12050815	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,129
SPM13012501	Captive F1 - A1	0,999/0,001	Eastern-A1	0,568
SPM13012502	Captive F1 - A1	0,998/0,002	Eastern-A1	0,485
SPM13012509	Western-B1	0,001/0,999	Western-B1	0,267
SPM12030509	Western-B1/B2	0,001/0,999	Western-B1	0,866
SPM12030510	Western-B2	0,001/0,999	Western-B2	0,538
SPM12030511	Western-B1/B2	0,001/0,999	Western-B2	0,172
SPM12030512	Western-B2	0,001/0,999	Western-B2	0,310
SPM12030513	Western-B1	0,001/0,999	Western-B1	0,690
SPM12030514	Western-B1	0,001/0,999	Western-B1	0,019
SPM12030515	Western-B1	0,001/0,999	Western-B1	0,895
SPM12030516	Western-B1	0,001/0,999	Western-B1	0,711
SPM12030517	Western-B1	0,001/0,999	Western-B1	0,797
SPM13012503	Captive F1 - B2	0,001/0,999	Western-B1	0,265
SPM13012504	Captive F1 - B1	0,001/0,999	Western-B1	0,801
SPM13012505	Captive F1 - B1&B2	0,001/0,999	Western-B1	0,563
SPM13012506	Captive F1 - B1	0,001/0,999	Western-B1	0,717
SPM13012507	Captive F1 - B1&B2	0,001/0,999	Western-B1	0,802
SPM13012508	Captive F1 - B1&B2	0,001/0,999	Western-B1	0,850

The two clusters correspond exactly to geographical sectors, with all the individuals from each sector clustering together. An eastern cluster is present, with all founders and descendents from population A1 assigned to this cluster. All of the captive individuals from B1 and B2 were assigned unambiguously to the western cluster. Only one eastern founder has rather little partial inferred ancestry (mean Q = 0.098) to the western sector. The rate at which individuals correctly assign to their sampled locality can also be used as an assessment of population genetic structure (Manel et al. 2005). GENECLASS assigned all individuals to their population of origin when the locality of highest probability was considered (Table 2). Only one misassignment was detected for localities belonging to the same cluster: a descendent of parents from B2 with a highest probability of assignment to population B1, though the probabilities were low (probability of assignment to B1 = 0.265, and B2 = 0.159). The population of origin of the two founders is uncertain, because individuals from B1 and B2 were mixed into the same aquaria.

Relatedness of individuals

The proportion of individual relatedness within each captive breeding line was similar (Table 3). Most individuals were unrelated, with percentages higher than 80%. Full sibling and parent-offspring relations represented percentages not exceeding the 6% except for the descendents of the western sector which presented the 13% of full-siblings. Finally, 11% of the founders from the western sector were half-siblings related. The estimated Queller and Goodnight (1989) index of relatedness among all founders and among descendants from each breeding line were similar and near 0 (mean r_{qg} eastern founders = -0.125, western founders = -0.111, eastern F1 = -0.063, western F1 = -0.200).

Effective population size and bottleneck

The estimated N_e for the eastern captive breeding line was 38.96 (median, 95% CI: 34.27-52.25), and N_e = 17.62 (median, 95% CI: 15.30-24.05) for the western captive breeding line (Table 3). Founders N_e estimates from both breeding lines were roughly 10, while effective population sizes estimated from offsprings were 17.03 and 7.97 for the eastern and western populations, respectively.

No captive population showed any signs of a recent bottleneck under neither the TPM (one tailed test for heterozygote excess) nor the SMM models (Suppl. Table 3). Instead, under the IAM model the eastern captive breeding line including founder and descendent groups as well as founders from the western sector showed a signature of excess of heterozygosity. In addition, the mode shift test showed a normal L-shape for the eastern captive breeding line, while a shifted mode was detected for the western breeding line when analyzing founders and F1 independently but not for the total captive stock.

Table 3. Estimates of effective population size (N_e) for each breeding line calculated with ONeSAMP, with estimations of the upper and lower 95% CI, and the proportion of individual relatedness within each breeding line. Values are compared to wild results obtained from Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI.

	Effective population size			Relatedness			
Group	N_e	95% Cis		Unrelated	Half Siblings	Full Siblings	Parent Offspring
Eastern							
Founder	10,20	9,20	12,18	97,22	2,78	0,00	0,00
F1	17,03	15,07	22,12	83,09	11,03	3,68	2,21
Total captive	38,96	34,27	52,25	85,85	8,31	2,77	3,08
Western							
Founder	10,93	9,38	15,07	86,67	11,11	0,00	2,22
F1	7,97	6,93	10,22	80,00	6,67	13,33	0,00
Total captive	17,62	15,30	24,05	83,33	9,17	1,67	5,83

Discussion

The main aim of the *Calotriton arnoldi* ex situ breeding program is to produce specimens for the reintroduction program into the restored habitat of the species. As has been shown in similar projects, the success of the program will depend on the genetic variability of the captive stock (Lacy 1994; Mitchell et al. 2011; Tzika et al. 2009). Decisions based on erroneous or incomplete data may lead to a decrease of genetic diversity, jeopardizing the long-term survival of the captive stock and affecting negatively the wild populations if captive specimens are reintroduced in the wild (Frankham 1995; Saccheri et al. 1998; Hedrick and Kalinowski 2000; Spielman et al. 2004). This is the first approach to the evaluation of the actual captive breeding program of the critically endangered Montseny brook newt.

Estimation of the genetic diversity present in the captive stock

Generally, 82% of the alleles present in the wild populations are also present in the captive stock, the percentages by sectors being 74% and 78% for the eastern and western sectors, respectively. Medium to high-frequency alleles detected in the wild populations are also observed within the set of captive individuals (Suppl. Table 2). Also, there is an acceptable representation of PA in the captive groups (76% and 81.5% of the wild private alleles are present in the eastern and western captivity groups, respectively). The results above, together the generally lower estimates of H_E of the captive stock than their wild counterparts, indicate that the individuals that conform the actual captive program are good enough but not optimal representatives of the genetic diversity present in the wild. Moreover, genetic theory indicates that modest numbers of founders, namely at least 20 unrelated wild individuals, are sufficient to capture 97.5% of the genetic diversity of the wild population within the founder population (Leus 2011). The current genetic differentiation values between the captive Montseny brook newts and wild populations is around 5-7%, and exceed the maximum 2.5% desired. Therefore, new genetic material should be incorporated by introducing new unrelated individuals or their sperm. Taking into account that this species present sperm storage, an ideal strategy to maximize the amount of genetic pool to the captive population causing the minimum impact to the wild populations could be the incorporation of wild-caught gravid females. Thus, descendants may retain the genetic diversity from individuals not kept in captivity.

Maintaining two distinct ESU's

According to the results of the Bayesian clustering algorithm and pairwise F_{ST}, a high genetic differentiation is observed between both breeding lines. This agrees with the significant genetic differentiation found between the eastern and western wild populations using both mitochondrial and nuclear markers. Also, the higher allelic richness observed in the eastern captive stock compared to the western one agrees with what has been found for the wild populations for both mitochondrial and nuclear makers, in which the eastern sector appears to be genetically richer than the western one (Valbuena-Ureña et al. 2013 – Chapter IV; Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI). Therefore, the maintenance of the two breeding lines separately is strongly suggested. Although outcrossing the two conservation units would be an action that may help to increase the genetic diversity (Frankham et al. 2010), we do not recommend it at this point for two main reasons: a) the importance of maintaining the two evolutionary groups, and b) the potential threat to the existing populations due to outbreeding depression (OD) (Allendorf and Luikart 2007). Existing conservation guidelines might focus on maintaining high levels of genetic diversity within the two distinct breeding lines. As being done so far, in case of re-introduction of individuals into brooks not occupied by this species at current time, it is important to keep in mind the origin of each larvae reared in order to avoid mixture of sectors.

Enlarging the captive breeding population

Although r_{qg} estimates among founders and descendents are near 0, relatedness percentages indicate that not all founders are unrelated, as it is generally assumed in a captive breeding program. Moreover, a drop of the effective population size is detected in the eastern captive group (N_e = 39) compared to the wild populations (N_e = 86; Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI), as well as in the western captive group (N_e = 18) compared to the wild populations (N_e = 80; Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI). This low value of N_e raises the possibility of inbreeding depression. The theoretical loss of genetic variation is $^{1}/_{2N_e}$ per generation (Montgomery et al. 2000; Allentoft and O'Brien 2010). The current N_e estimated based on these genetic results for each captive breeding line was 39-18 individuals. With an estimated generation time of 5 years per generation (Carbonell et al. 2013), the calculated proportion of initial heterozygosity retained in 100 years (20 generations) would be 74.36% and 44.44% for the eastern and western captive breeding lines, respectively. Although generation time could be expanded by manipulating the age of breeding, this loss of heterozigosity could compromise the traditionally accepted goal in captive breeding programs to maintain 90% of the initial genetic variation within 100 years.

Following the Amphibian Ark guidelines, at least 20 unrelated founders by sector to survive and breed with an equal sex ratio would be required. The minimum genetic target population size, defined as the minimum population size needed to meet the genetic goals of a 100 years program is 320 individuals by sector, assuming individual management, age to maturity over 5 years and reproductive lifespan of 15 years or less (Shad 2008). In order to achieve the target of self-sustainability of the captive population during a long period of time, very variable descendants should be included into the program. Nonetheless, the non-optimal representation of the total genetic diversity present in the wild seen above elucidate the need of introducing additional individuals into the two ex situ breeding lines.

The expected heterozygosity (H_E) of the captive eastern stock is significantly lower than that of the wild populations (p = 0.0082), indicating that the eastern captive stock only represents part of the existing gene pool of the eastern wild populations. Captive individuals of this breeding line originate from a single population (A1). As suggested by previous analyses of both mitochondrial and nuclear data, the eastern populations are grouped into two clusters, being population A3 the most differentiated and populations A1 and A2 the less differentiated, clustering together in the microsatellite analysis (Valbuena-Ureña et al. 2013 – Chapter IV; Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI). Therefore, it is recommended to introduce further individuals, mainly from the wild population A3.

No differences were observed between captive and wild western populations, although a tendency towards smaller average heterozygosities was observed in the wild. Nonetheless, in order to reduce the 11% of half-siblings relatedness detected among the western founders and to avoid the possibility of inbreeding, an increase of breeder individuals from this sector is also recommended. According to microsatellite data, the western sector clusters into two groups, the main one formed by populations B1, B2 and B4, and the other one by population B3, which is separated into a distinct cluster (Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI). Whereas overall western H_E is 0.352, the heterozygosity increases up to 0.423 when population B3 is excluded. The low genetic diversity (H_E =0.197) detected in this population biases the mean western wild H_E value. Currently there are no founders from B3, but as a result of its low genetic diversity it is unadvisable to have further breeders from this site. Therefore, in case of incorporating additional founders to this breeding line, individuals from B1, B2 and B4 should be prioritized.

So, with the aim of minimizing relatedness among breeders and avoiding the inbreeding of low effective size breeding groups it is recommended to incorporate additional specimens to the breeding stock. However, in order to properly identify the best candidates and to clarify their origin and relatedness with other captive individuals, specimens must be genotyped before being incorporated into the captive population.

A need for periodic re-evaluation

Similar values of rarefied allelic richness are found among founders and descendants, a fact that indicates that the descendants inherited almost all the microsatellite alleles from the founders. Eleven and two new PA were found in the descendent group not detected in the founders, regarding the eastern and western sectors respectively. This fact could be explained by many reasons; the first, there are five founders that could not be included in the present analyses, as individuals died before they could be sampled; second, some founder females were already gravid when they were caught in the wild, so the genotype of the males was unknown; and third, some females could fertilize their eggs with sperm from wild males stored in their reproductive apparatus using sperm storage, a strategy suggested for *C. arnoldi* (Alonso 2013) and present in many urodel species (Kühnel et al. 2010). Therefore it is highly recommended that further descendents in subsequent offspring's are genotyped in other to ensure that genetic diversity is maintained over time.

The use of molecular data has been useful to investigate the relatedness among individuals for the design of optimal mating groups and has allowed the identification of the natural population from which the founders originated. It is thus underlined the importance of using molecular markers to evaluate genetic management of captive breeding programs. Moreover, it is crucial to detect population bottlenecks in managed species because a reduction in N_e may enhance the rate of inbreeding, loss of genetic variation and fixation of deleterious alleles considerably and thereby increase the risk of population extinction (Luikart et al. 1998). Nevertheless, as the captive breeding program of the Montseny brook newt was founded very recently (less than 10 years have passed) it can be difficult to identify losses of genetic variation or a possible founder effect due to the short period of time. Therefore, the captive stock and subsequent cohorts should be long-term monitored in order to preserve genetic variation. Moreover, further analyses focusing on the resolution of the pedigree to avoid possible mating of closely related individuals, deterministic parental assignment of offspring and the suggestion of optimal mating groups for maximizing diversity are needed. The current breeding protocol, which has been started using in this program, and which is widely used by many captive breeding programs to minimize loss of genetic diversity is pairing individuals according to the mean kinship (MK) (Willoughby et al. 2015), which is based on the number and degree of relatives that the individual has in the captive stock.

Finally, a problem associated to small founder populations is their significant rapid adaptation to captivity (Griffiths and Pavajeau 2008; Gilligan and Frankham 2003; Frankham 2008; Witzenberger and Hochkirch 2011). A possible solution would be to regularly renew the captive populations with previously genotyped individuals from the wild, thereby reducing adaptation to captivity to a minimum. In fact, we suggest building an open system that allows the continuous gene flow from wild to captive populations. As a consequence of open population management, the minimum size of the captive populations needed to achieve the standard current goal of being successful and "self-sustainable" could be slightly smaller.

Acknowledgements

We are grateful to all members of the CRFS Torreferrussa. We also thank the DAAM department of the Generalitat de Catalunya, the staff of Parc Natural del Montseny of the Diputació de Barcelona, and F. Amat. This research was supported by Miloca and Zoo de Barcelona (PRIC-2011). S.C. is supported by a grant CGL2012-36970 from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (co-funded by FEDER). We thank Ralf Hendrix for performing the primary microsatellite loci analysis in the laboratory.

References

Alonso M (2013) Influència de l'edat en la cria en captivitat del Tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*). Final grade report, Universitat de Lleida, Lleida

Allendorf FW, Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell, Oxford

Allentoft M, O'Brien J (2010) Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: a review. Diversity 2 (1):47-71

Amat F, Carranza S (2005) Estudi demogràfic del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) al Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny. vol Parc Natural del Montseny. Memòria 2005. Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona, Barcelona

Amat F, Carranza S, Valbuena-Ureña E, Carbonell F (2014) Saving the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) from extinction: an assessment of eight years of research and conservation. FroLog, vol 22(3).

Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? Heredity 87 (3):257-265. doi:10.1046/j.1365-2540.2001.00940.x

Ballou JD, Foose TJ (1996) Demographic and genetic management of captive populations. In: Kleiman D, Lumpkin S, Allen M, Harris H, Thompson K (eds) Wild mammals in captivity. University of Chicago Press, Chicago, IL, pp 263-283

Ballou JD, Lacy RC (1995) Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations. In: Ballou JD, Gilpin E, Foose TJ (eds)

Population management for survival and recovery: analytical methods and strategies in small population conservation. Columbia University Press, New York, pp 76-111

Ballou JD, Lees C, Faust LJ, Long S, Lynch C, Lackey LB, Foose TJ (2010) Demographic and genetic management of captive populations. In: Kleiman D, Thompson KV, Bear CK (eds) Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management. University of Chicago Press, Chicago, pp 219-252

Ballou JD, Miller PS, Xie Z, Wei R, Zhang H, Zhang A, Huang S, Sun S, David VA, O'Brien SJ, Traylor-Holzer K (2006) Analysis of demographic and genetic trends for developing a captive breeding masterplan for the giant panda. In: Wildt DE, Zhang A, Zhang H, Donal L, Janssen D, Ellis S (eds) Giant pandas: biology, veterinary medicine and management. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 495-519

Briscoe DA, Malpica JM, Robertson A, Smith GJ, Frankham R, Banks RG, Barker JSF (1992) Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: implications for the genetic management of captive populations. Conservation Biology 6 (3):416-425. doi:10.1046/j.1523-1739.1992.06030416.x

Carbonell F, Obon E, Alonso M, Valbuena-Ureña E, Larios R (2013) Reserva genètica i cria en captivitat del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*). In: Such-Sanz À, Mayné J, Pomarol M (eds) Activitats realitzades pel centre de fauna de Torreferrussa. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural - Forestal Catalana, S.A., Barcelona, pp. 52-66

Carbonell F, Obon E, Alonso M, Valbuena-Ureña E, Larios R (2014) Reserva genètica i cria en captivitat del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*). In: Such-Sanz À, Mayné J, Pomarol M (eds) Activitats realitzades pel centre de fauna de Torreferrussa. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural - Forestal Catalana, S.A., Barcelona. Informe inèdit.

Carranza S, Amat F (2005) Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula. Zoological Journal of the Linnean Society 145 (4):555-582. doi:10.1111/j.1096-3642.2005.00197.x

Carranza S, Martínez-Solano I (2009) *Calotriton arnoldi*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. Accessed 04 July 2012

Conde DA, Flesness N, Colchero F, Jones OR, Scheuerlein A (2011) Zoos can lead the way with ex situ conservation. WAZA Magazine 12:26-29

Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144 (4):2001-2014

DAAM (in progress) Programa de cria en captivitat del Tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*). vol Technical report. Departament d’Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi

Natural. Direcció General del Medi Natural i Biodiversitat. Generalitat de Catalunya, Barcelona

Drechsler A, Geller D, Freund K, Schmeller DS, Künzel S, Rupp O, Loyau A, Denoël M, Valbuena-Ureña E, Steinfartz S (2013) What remains from a 454 run: estimation of success rates of microsatellite loci development in selected newt species (*Calotriton asper*, *Lissotriton helveticus*, and *Triturus cristatus*) and comparison with Illumina-based approaches. Ecology and Evolution 3 (11):3947-3957. doi:10.1002/ece3.764

Earl D, vonHoldt B (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genet Resour 4 (2):359-361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7

Edwards T, Cox EC, Buzzard V, Wiese C, Hillard LS, Murphy RW (2014) Genetic assessments and parentage analysis of captive bolson tortoises (*Gopherus flavomarginatus*) inform their "rewilding" in New Mexico. PLoS ONE 9 (7):e102787. doi:10.1371/journal.pone.0102787

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14 (8):2611-2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10 (3):564-567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

Frankham R (1995) Conservation genetics. Annual Review of Genetics 29 (1):305-327. doi:doi:10.1146/annurev.ge.29.120195.001513

Frankham R (2003) Genetics and conservation biology. Comptes Rendus Biologies 326:22-29. doi:10.1016/S1631-0691(03)00023-4

Frankham R (2008) Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology 17 (1):325-333. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03399.x

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2010) Introduction to conservation genetics. 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge

Gilligan DM, Frankham R (2003) Dynamics of genetic adaptation to captivity. Conservation Genetics 4 (2):189-197. doi:10.1023/A:1023391905158

Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity 86 (6):485-486

Griffiths RA, Pavajeau L (2008) Captive breeding, reintroduction, and the conservation of amphibians. Conservation Biology 22 (4):852-861

Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48 (2):361-372. doi:10.2307/2532296

Hedrick PW, Kalinowski ST (2000) Inbreeding depresion in conservation biology. Annual Review of Ecology and Systematics 31 (1):139-162. doi:doi:10.1146/annurev.ecolsys.31.1.139

Höglund J (2009) Evolutionary conservation genetics. Oxford University Press,

Kalinowski ST (2005) Hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. Molecular Ecology Notes 5 (1):187-189. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00845.x

Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. Molecular Ecology Notes 6 (2):576-579. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x

Kühnel S, Reinhard S, Kupfer A (2010) Evolutionary reproductive morphology of amphibians: an overview. Bonn Zoological Bulletin 57 (2):119-126

Lacy RC (1994) Managing genetic diversity in captive populations of animals. In: Bowles ML, Whelan CJ (eds) Restoration of endangered species: conceptual issues, planning and implementation. Cambridge University Press, Great Britain, pp 63-89

Lacy RC (1997) Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. Journal of Mammalogy 78 (2):320-335

Lacy RC (2009) Stopping evolution: genetic management of captive populations. In: Amato G, DeSalle R, Ryder OA, Rosenbaum HC (eds) Conservation genetics in the age of genomics. Columbia University Press, New York, pp 58 - 81

Leus K (2011) Captive breeding and conservation. Zoology in the Middle East 54 (Supplement 3):151-158

Lewis PO, Zaykin D (2000) Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data, version 1.0. (d15). University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA.

Luikart G, Allendorf F, Cornuet J-M, Sherwin W (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. Journal of Heredity 89 (3):238-247. doi:10.1093/jhered/89.3.238

Luikart G, Cornuet J-M (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. Conservation Biology 12 (1):228-237. doi:10.1111/j.1523-1739.1998.96388.x

Lyles AM, May RM (1987) Problems in leaving the ark. Nature 326:245-246

Mace G (1986) Genetic management of small populations. International Zoo Yearbook 24 (1):167-174. doi:10.1111/j.1748-1090.1985.tb02534.x

Mace G, Pemberton JM, Stanley H Conserving genetic diversity with the help of biotechnology-desert antelopes as an example. In: Biotechnology and the conservation of genetic diversity. Proc. symposium, London, 1990, 1992. pp 123-134

Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS (2005) Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. Trends in Ecology & Evolution 20 (3):136-142. doi:10.1016/j.tree.2004.12.004

Mitchell A, Lau J, Chemnick L, Thompson E, Alberts A, Ryder O, Gerber G (2011) Using microsatellite diversity in wild Anegada iguanas (*Cyclura pinguis*) to establish relatedness in a captive breeding group of this critically endangered species. Conservation Genetics 12 (3):771-781. doi:10.1007/s10592-011-0184-2

Montgomery M, Woodworth L, Nurthen R, Gilligan D, Briscoe D, Frankham R (2000) Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. Conservation Genetics 1 (1):33-43. doi:10.1023/a:1010173401557

Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. Molecular Ecology 13 (1):55-65. doi:10.1046/j.1365-294X.2004.02008.x

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6 (1):288-295. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. Journal of Heredity 95 (6):536-539. doi:10.1093/jhered/esh074

Piry S, Luikart G, Cornuet J-M (1999) Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. Journal of Heredity 90 (4):502-503. doi:10.1093/jhered/90.4.502

Princée FP (1995) Overcoming the constraints of social structure and incomplete pedigree data through low-intensity genetic management. In: Ballou JD, M G, J FT (eds) Population management for survival and recovery: analytical methods and strategies in small population conservation. Columbia University Press, New York, pp 124-154

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155 (2):945-959

Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. Evolution 43 (2):258-275

Ralls K, Ballou J (1986) Captive breeding programs for populations with a small number of founders. Trends in Ecology & Evolution 1 (1):19-22. doi:10.1016/0169-5347(86)90062-5

Ralls K, Ballou J Managing genetic diversity in captive breeding and reintroduction programs. In: Transactions of the North American Wildlife and Natural Resources Conference, 1992. pp 263-282

Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. Conservation Biology 17 (1):230-237. doi:10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x

Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8 (1):103-106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. Nature 392:491-494

Senner JW (1980) Inbreeding depression and the survival of zoo populations. In: Soulé ME, Wilcox BA (eds) Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp 209-224

Shad K Amphibian population management guidelines. In: Shad K (ed) Amphibian Ark Amphibian Population Management Workshop, San Diego, California, USA, 2007 December 10-11 2008. Amphibian Ark, www.amphibianark.org, p 31

Soulé M, Gilpin M, Conway W, Foose T (1986) The millenium ark: How long a voyage, how many staterooms, how many passengers? Zoo Biology 5 (2):101-113. doi:10.1002/zoo.1430050205

Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (42):15261-15264. doi:10.1073/pnas.0403809101

Tallmon DA, Koyuk A, Luikart G, Beaumont MA (2008) ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. Molecular Ecology Resources 8 (2):299-301. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01997.x

Traylor-Holzer K (2011) Identifying gaps and opportunities for inter-regional ex situ species management. WAZA Magazine 12:30-33

Tzika A, Remy C, Gibson R, Milinkovitch M (2009) Molecular genetic analysis of a captive-breeding program: the vulnerable endemic Jamaican yellow boa. Conservation Genetics 10 (1):69-77. doi:10.1007/s10592-008-9519-z

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

Valbuena-Ureña E, Soler-Membrives A, Steinfartz S, Carranza S (Chapter VI) Advantage or burden – habitat fragmentation in a critically endangered amphibian species (*Calotriton arnoldi*) and its implications for species conservation.

Valbuena-Ureña E, Steinfartz S, Carranza S (2014) Characterization of microsatellite loci markers for the critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). Conservation Genet Resour 6 (2):263-265. doi:10.1007/s12686-013-0082-7

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4 (3):535-538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Wake DB, Vredenburg VT (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 105 (Supplement 1):11466-11473. doi:10.1073/pnas.0801921105

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38 (6):1358-1370

Wilcoxon F (1945) Individual comparisons by ranking methods. Biometrics Bulletin 1 (6):80-83. doi:10.2307/3001968

Williams SE, Hoffman EA (2009) Minimizing genetic adaptation in captive breeding programs: a review. Biological Conservation 142 (11):2388-2400. doi:10.1016/j.biocon.2009.05.034

Willis K (1993) Use of animals with unknown ancestries in scientifically managed breeding programs. Zoo Biology 12 (2):161-172. doi:10.1002/zoo.1430120203

Willis K, Willis RE (2010) How many founders, how large a population? Zoo Biology 29 (5):638-646. doi:10.1002/zoo.20310

Willoughby JR, Fernandez NB, Lamb MC, Ivy JA, Lacy RC, DeWoody JA (2015) The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. Molecular Ecology 24 (1):98-110. doi:10.1111/mec.13020

Witzenberger K, Hochkirch A (2011) Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. Biodiversity and Conservation 20 (9):1843-1861. doi:10.1007/s10531-011-0074-4

Supplementary table 1a. Estimates of genetic parameters for the eastern breeding line by locus. N, sample size; A, number of alleles per locus; Ar, allelic richness; PA, number of private alleles; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; F_{IS}, inbreeding coefficient. Values in bold indicate statistical significance after Bonferroni correction.

	Locus	Calarn 02248	Ca3	Calarn 29994	Ca21	Calarn 37825	Calarn 14961	Calarn 15906	Calarn 12022	Calarn 06881	Ca7	Ca22	Calarn 50748	CA8	Calarn 36791	Calarn 59202	Ca 32	Calarn 52354	Calarn 30143	Calarn 31321	Calarn 15136	Calarn 37884	US2	Us3	Us7	Overall
Eastern founders	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	A	5,000	2,000	2,000	2,000	5,000	4,000	4,000	4,000	3,000	4,000	1,000	2,000	4,000	4,000	3,000	4,000	2,000	4,000	4,000	3,000	4,000	5,000	4,000	3,000	3,417
	Ar	4,617	1,976	1,902	2,000	4,471	3,799	3,662	3,333	2,642	3,897	1,000	2,000	3,471	3,892	2,333	3,564	1,902	3,642	3,569	2,666	3,642	4,000	3,657	2,662	3,100
	PA	5	2	1	1	1	1	3	2	2	2	1	0	3	3	1	2	1	2	4	0	3	0	4	2	46
	H_O	1,000	0,333	0,222	0,556	0,889	0,667	0,889	0,556	0,444	0,444	0,000	0,667	0,444	0,889	0,222	0,667	0,222	0,889	0,667	0,444	0,778	0,778	0,778	0,333	0,574
	H_E	0,753	0,278	0,198	0,475	0,710	0,617	0,685	0,574	0,364	0,716	0,000	0,444	0,451	0,691	0,204	0,562	0,198	0,642	0,623	0,475	0,660	0,630	0,648	0,426	0,501
	F_{IS}	-0,274	-0,143	-0,067	-0,111	-0,196	-0,021	-0,243	0,091	-0,164	0,429	-	-0,455	0,072	-0,231	-0,032	-0,129	-0,067	-0,333	-0,011	0,123	-0,120	-0,179	-0,143	0,273	-0,088
Eastern F1	N	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
	A	6,000	3,000	2,000	2,000	6,000	3,000	4,000	5,000	3,000	4,000	2,000	4,000	5,000	5,000	3,000	3,000	4,000	4,000	6,000	3,000	3,000	5,000	3,000	2,000	3,750
	Ar	4,508	2,579	1,353	2,000	3,646	2,874	3,643	4,372	2,687	3,864	1,353	2,941	3,446	3,830	1,941	2,811	3,203	3,430	4,221	2,840	2,742	3,679	2,825	1,982	3,030
	PA	6	3	1	1	3	1	3	2	2	2	1	1	4	4	2	2	2	2	6	0	2	0	3	2	55
	H_O	0,882	0,529	0,059	0,529	0,647	0,412	0,706	0,765	0,412	0,706	0,059	0,471	0,353	0,706	0,176	0,471	0,353	0,588	0,824	0,471	0,647	0,706	0,588	0,471	0,522
	H_E	0,697	0,469	0,057	0,493	0,619	0,517	0,663	0,683	0,420	0,720	0,057	0,580	0,606	0,621	0,164	0,458	0,528	0,644	0,687	0,569	0,555	0,621	0,512	0,360	0,513
	F_{IS}	-0,237	-0,099	0,000	-0,043	-0,014	0,233	-0,035	-0,089	0,051	0,050	0,000	0,217	0,442	-0,107	-0,043	0,004	0,358	0,116	-0,170	0,202	-0,135	-0,107	-0,119	-0,280	0,012
Eastern total captive	N	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
	A	6,000	3,000	2,000	2,000	7,000	4,000	4,000	5,000	3,000	4,000	2,000	4,000	6,000	5,000	4,000	4,000	4,000	4,000	6,000	3,000	4,000	5,000	4,000	3,000	4,083
	Ar	4,543	2,385	1,553	2,000	4,016	3,234	3,582	4,132	2,672	3,829	1,231	2,642	3,420	3,858	2,015	3,017	2,903	3,412	4,103	2,746	3,040	3,621	3,382	2,204	3,060
	PA	6	3	1	1	3	1	3	2	2	2	1	1	4	4	2	2	2	2	6	0	3	0	4	2	57
	H_O	0,923	0,462	0,115	0,538	0,731	0,500	0,769	0,692	0,423	0,615	0,038	0,538	0,385	0,769	0,192	0,538	0,308	0,692	0,769	0,462	0,692	0,731	0,654	0,423	0,540
	H_E	0,739	0,411	0,109	0,488	0,659	0,557	0,674	0,663	0,406	0,729	0,038	0,550	0,572	0,652	0,179	0,499	0,434	0,649	0,675	0,582	0,597	0,625	0,576	0,384	0,519
	F_{IS}	-0,231	-0,103	-0,042	-0,084	-0,089	0,122	-0,122	-0,024	-0,022	0,175	0,000	0,040	0,345	-0,161	-0,055	-0,061	0,309	-0,047	-0,120	0,226	-0,141	-0,150	-0,115	-0,083	-0,022

Supplementary table 1b. Estimates of genetic parameters for the western breeding line by locus. N, sample size; A, number of alleles per locus; Ar, allelic richness; PA, number of private alleles; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; F_{IS}, inbreeding coefficient. Values in bold indicate statistical significance after Bonferroni correction.

	Locus	Calarn 02248	Ca3	Calarn 29994	Ca21	Calarn 37825	Calarn 14961	Calarn 15906	Calarn 12022	Calarn 06881	Ca7	Ca22	Calarn 50748	CA8	Calarn 36791	Calarn 59202	Ca 32	Calarn 52354	Calarn 30143	Calarn 31321	Calarn 15136	Calarn 37884	US2	Us3	Us7	Overall
Western founders	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	A	3,000	4,000	3,000	3,000	6,000	3,000	1,000	4,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	4,000	2,000	3,000	3,000	3,000	3,000	1,000	4,000	1,000	1,000	2,917
	Ar	2,551	3,848	2,600	2,600	5,000	2,600	1,000	3,803	2,936	2,596	2,596	2,853	2,705	2,985	3,547	1,853	2,985	2,200	2,705	2,838	1,000	3,803	1,000	1,000	2,650
	PA	3	4	2	1	3	0	0	0	2	1	2	0	1	0	2	0	0	0	4	0	1	1	1	0	28
	H_O	0,200	0,900	0,400	0,600	0,600	0,400	0,000	0,800	0,500	0,400	0,400	0,700	0,300	0,500	0,600	0,200	0,800	0,200	0,300	0,500	0,000	0,600	0,000	0,000	0,413
	H_E	0,335	0,715	0,515	0,535	0,740	0,545	0,000	0,675	0,515	0,445	0,445	0,585	0,340	0,620	0,610	0,180	0,635	0,185	0,340	0,460	0,000	0,675	0,000	0,000	0,421
	F_{IS}	0,446	-0,209	0,273	-0,069	0,239	0,314	-	-0,134	0,082	0,153	0,153	-0,145	0,169	0,244	0,069	-0,059	-0,210	-0,029	0,169	-0,034	-	0,163	-	-	0,072
Western F1	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	A	2,000	4,000	3,000	2,000	5,000	3,000	2,000	2,000	4,000	2,000	2,000	2,000	2,000	3,000	4,000	1,000	3,000	2,000	2,000	2,000	2,000	3,000	1,000	1,000	2,458
	Ar	2,000	4,000	3,000	2,000	5,000	3,000	2,000	2,000	4,000	2,000	2,000	2,000	2,000	3,000	4,000	1,000	3,000	2,000	2,000	2,000	2,000	3,000	1,000	1,000	2,460
	PA	2	4	2	1	2	0	0	0	3	1	1	0	1	0	2	0	0	0	2	0	2	0	1	0	24
	H_O	0,167	0,667	1000	1000	1000	0,833	0,167	0,333	0,833	1000	1000	0,500	0,333	0,500	0,667	0,000	0,833	0,167	0,333	0,167	0,167	0,500	0,000	0,000	0,507
	H_E	0,153	0,681	0,611	0,500	0,792	0,625	0,153	0,444	0,653	0,500	0,500	0,486	0,278	0,403	0,653	0,000	0,569	0,153	0,278	0,153	0,153	0,542	0,000	0,000	0,387
	F_{IS}	0,000	0,111	-0,579	-1000	-0,176	-0,250	0,000	0,333	-0,190	-1000	-1000	0,063	-0,111	-0,154	0,070	-	-0,389	0,000	-0,111	0,000	0,000	0,167	-	-	-0,227
Western total captive	N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	A	3,000	4,000	3,000	3,000	6,000	3,000	2,000	4,000	4,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	4,000	2,000	3,000	3,000	4,000	3,000	2,000	4,000	1,000	1,000	3,083
	Ar	2,387	3,819	2,770	2,375	4,953	2,770	1,375	3,384	3,290	2,374	2,374	2,617	2,482	2,934	3,551	1,617	2,971	1,992	2,851	2,540	1,375	3,479	1,000	1,000	2,590
	PA	3	4	2	1	3	0	0	0	3	1	2	0	1	0	2	0	0	0	4	0	2	1	1	0	30
	H_O	0,188	0,813	0,625	0,750	0,750	0,563	0,063	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,313	0,500	0,625	0,125	0,813	0,188	0,313	0,375	0,063	0,563	0,000	0,000	0,448
	H_E	0,275	0,711	0,576	0,525	0,779	0,580	0,061	0,607	0,576	0,490	0,490	0,555	0,320	0,564	0,631	0,117	0,623	0,174	0,328	0,361	0,061	0,633	0,000	0,000	0,418
	F_{IS}	0,348	-0,111	-0,053	-0,401	0,070	0,063	0,000	0,003	-0,053	-0,245	-0,245	-0,095	0,057	0,146	0,042	-0,034	-0,275	-0,047	0,080	-0,006	0,000	0,143	-	-	-0,039

Supplementary table 2. Microsatellite allele frequencies in wild and captive populations of the Montseny brook newt. Sample sizes at each locus are also provided. Data from wild specimens were obtained from Valbuena-Ureña et al. – Chapter VI.

		Eastern		Western	
Locus	**Allele size (bp)**	**Wild**	**Captive**	**Wild**	**Captive**
Calarn02248	**169**	-	-	0,072	0,094
	173	-	-	0,711	0,844
	177	-	-	0,217	0,063
	185	0,006	0,038	-	-
	193	0,045	0,212	-	-
	197	0,357	0,192	-	-
	201	0,487	0,404	-	-
	205	0,097	0,115	-	-
	209	0,006	0,038	-	-
Ca3	**233**	-	-	0,096	0,125
	237	-	-	0,681	0,375
	241	-	-	0,066	0,188
	245	-	-	0,157	0,313
	249	0,201	0,038	-	-
	253	0,435	0,731	-	-
	257	0,273	0,231	-	-
	261	0,084	-	-	-
	265	0,006	-	-	-
Calarn29994	**169**	0,026	0,058	-	-
	173	0,961	0,942	0,018	-
	177	0,013	-	0,735	0,500
	181	-	-	0,199	0,406
	185	-	-	0,048	0,094
Ca21	**232**	-	-	0,572	0,531
	236	0,117	-	0,410	0,438
	240	0,266	0,423	0,012	0,031
	244	0,487	0,577	-	-
	248	0,097	-	-	-
	252	0,032	-	-	-
	257	-	-	0,006	-
Calarn37825	**211**	-	-	0,030	0,094
	215	-	-	0,229	0,250
	219	-	-	0,036	-
	223	-	-	0,012	0,031
	227	0,019	-	0,006	-
	231	0,071	0,038	0,157	0,125
	235	0,149	0,058	0,392	0,188
	239	0,149	0,038	0,127	0,313
	243	0,240	0,019	-	-
	247	0,208	0,462	0,012	-
	251	0,149	0,346	-	-
	255	0,013	0,038	-	-

Calarn14961	**201**	0,416	0,212	-	-
	205	0,084	-	0,012	-
	209	0,045	0,135	0,386	0,438
	213	0,266	0,615	0,560	0,469
	217	0,039	-	0,018	0,094
	221	0,130	0,038	0,006	-
	225	0,019	-	0,018	-
Calarn15906	**105**	-	-	0,018	-
	108	0,006	-	0,934	0,969
	113	0,156	0,442	0,048	0,031
	116	0,481	0,173	-	-
	121	0,221	0,308	-	-
	125	0,110	0,077	-	-
	129	0,026	-	-	-
Calarn12022	**220**	0,019	-	-	-
	224	0,039	0,077	0,024	0,094
	226	0,506	0,519	-	-
	232	0,065	0,192	0,006	-
	236	0,058	0,077	0,337	0,313
	240	0,091	-	0,470	0,531
	244	0,136	-	0,163	0,063
	248	0,052	0,135	-	-
	252	0,032	-	-	-
Calarn06881	**154**	0,026	-	-	-
	158	0,097	-	-	-
	162	0,175	0,135	-	-
	166	0,571	0,750	-	-
	170	0,019	-	0,006	-
	174	0,110	0,115	0,108	0,188
	178	-	-	0,181	0,188
	182	-	-	0,639	0,594
	186	-	-	0,060	0,031
	190	-	-	0,006	-
Ca7	**224**	0,305	0,250	-	-
	228	0,532	0,288	-	-
	232	0,117	0,327	0,241	0,031
	236	0,045	0,135	0,133	0,344
	240	-	-	0,608	0,625
	244	-	-	0,018	-
Ca22	**126**	-	-	0,500	0,625
	130	0,006	-	-	-
	134	0,753	0,981	-	-
	138	0,227	0,019	0,414	0,344
	142	0,013	-	0,043	-
	146	-	-	0,043	0,031
Calarn50748	**201**	0,013	-	-	-
	205	0,117	0,038	-	-

	209	0,675	0,519	0,319	0,063
	213	0,169	0,423	0,295	0,500
	217	0,026	0,019	0,386	0,438
CA8	**180**	-	-	0,319	0,125
	184	0,026	0,019	0,651	0,813
	188	0,175	0,019	0,030	0,063
	192	0,506	0,596	-	-
	196	0,110	0,250	-	-
	200	0,091	0,096	-	-
	204	0,091	-	-	-
	208	-	0,019	-	-
Calarn36791	**120**	0,110	-	-	-
	124	0,013	-	0,036	0,219
	128	0,058	0,058	0,861	0,594
	132	0,006	-	0,102	0,188
	136	0,201	0,519	-	-
	140	0,422	0,192	-	-
	144	0,156	0,192	-	-
	148	0,032	0,038	-	-
Calarn59202	**212**	-	-	0,169	0,219
	216	-	-	0,705	0,531
	220	0,019	-	-	0,063
	224	0,688	0,904	-	-
	228	0,201	0,058	0,120	0,188
	232	0,065	0,019	0,006	-
	236	0,026	-	-	-
	240	-	0,019	-	-
Ca32	**185**	0,175	0,173	-	-
	189	0,636	0,673	-	-
	193	0,175	0,135	0,910	0,938
	197	0,013	0,019	0,090	0,063
Calarn52354	**220**	0,071	0,019	-	-
	224	0,643	0,731	0,241	0,281
	228	0,149	0,115	0,235	0,500
	232	0,019	-	0,524	0,219
	236	0,019	-	-	-
	240	0,097	0,135	-	-
Calarn30143	**186**	0,097	-	-	-
	190	0,084	0,135	-	-
	198	0,396	0,365	-	-
	202	0,032	-	-	-
	222	0,136	-	0,036	0,063
	226	0,240	0,442	0,157	0,031
	230	0,013	0,058	0,699	0,906
	234	-	-	0,084	-
	238	-	-	0,024	-
Calarn31321	**148**	-	-	0,066	0,063

	152	-	-	0,873	0,813
	157	-	-	0,042	0,063
	161	-	-	0,018	0,063
	173	0,110	0,038	-	-
	177	0,052	0,077	-	-
	181	0,442	0,481	-	-
	185	0,156	0,269	-	-
	189	0,182	0,115	-	-
	193	0,058	0,019	-	-
Calarn15136	**165**	0,032	0,096	0,428	0,156
	169	0,812	0,442	0,024	-
	173	0,123	0,462	0,512	0,781
	177	0,032	-	0,036	0,063
Calarn37884	**240**	-	-	0,036	0,031
	244	-	-	0,783	0,969
	248	0,279	0,346	0,006	-
	252	0,143	0,019	-	-
	256	0,305	0,115	-	-
	260	0,188	0,519	-	-
	267	0,084	-	0,175	-
US2	**219**	-	-	0,054	0,063
	223	0,045	0,077	0,024	-
	227	0,292	0,519	0,620	0,500
	231	0,377	0,308	0,133	0,313
	235	0,188	0,058	0,163	0,125
	239	0,097	0,038	0,006	-
Us3	**143**	-	-	1,000	1,000
	155	0,104	0,077	-	-
	159	0,662	0,596	-	-
	163	0,208	0,231	-	-
	167	0,026	0,096	-	-
Us7	**222**	0,006	-	-	-
	226	0,071	0,231	-	-
	234	0,792	0,750	-	-
	238	0,130	-	-	-
	246	-	0,019	1,000	1,000

Supplementary table 3. Test for detection of recent bottlenecks implemented in BOTTLENECK following the infinite allele (IAM), stepwise mutation (SMM), and two-phase mixed (TPM) models (values in bold indicate statistical significance). Results for the Mode-shift test (modes are indicated by - for normal L-shaped and + for shifted mode).

Group	IAM	TPM	SMM	Mode-shift
Eastern				
Founder	**0,033**	0,710	0,857	-
F1	**0,009**	0,855	0,940	-
Total captive	**0,007**	0,952	0,980	-
Western				
Founder	**0,035**	0,663	0,715	+
F1	0,052	0,406	0,568	+
Total captive	0,099	0,759	0,797	-

VIII. RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

The more you know about a species, the more you understand about how better to help protect them

Alan Clark

1. RESUM DELS RESULTATS

L'objectiu d'aquesta tesi va ser proporcionar dades genètiques rellevants i assessorament per ajudar i millorar la gestió contínua de *C. arnoldi*. La biogeografia de l'espècie (Capítol IV), el disseny de marcadors moleculars polimòrfics (Capítol V), la caracterització i estructura genètica de les poblacions (Capítol VI) i l'avaluació del programa de la conservació ex situ de l'espècie (Capítol VII) es van dur a terme per assolir aquest objectiu.

Els resultats obtinguts en el Capítol IV confirmen que, tot i que les dues espècies del gènere *Calotriton* s'han originat recentment i són dues espècies ecològicament similars i geogràficament molt properes, no hi ha cap senyal d'hibridació entre elles. Per tant, es confirma la validesa taxonòmica de les dues espècies i refuta que hi hagi hagut contacte entre *C. asper* i *C. arnoldi* posterior al procés d'especiació. A més, en aquest capítol es revela una alta estructura genètica en el tritó del Montseny, tot i el seu reduït rang de distribució, en comparació amb el tritó pirinenc. Les anàlisis moleculars i morfològiques indiquen l'existència de dos grups poblacionals geogràficament diferenciats, amb absència de flux genètic entre ells, el sector oriental i el sector occidental.

Els quinze *loci* polimòrfics descrits al Capítol V juntament amb els nou *loci* desenvolupats per *C. asper* i que s'han amplificat amb èxit en *C. arnoldi* (Drechsler et al. 2013), proporcionen una eina poderosa per abordar els estudis de genètica de conservació desenvolupats en els capítols posteriors.

El Capítol VI conclou que la fragmentació de l'hàbitat natural d'aquesta espècie s'ha traduït en una forta divisió genètica de les poblacions en dos sectors, sense migració detectable entre aquests. Encara que les estimacions de mida poblacional efectives suggereixen valors críticament baixos per a totes les poblacions, no s'ha trobat evidència d'alts nivells de consanguinitat entre els individus dins de les poblacions. Així, els nivells de diversitat genètica de *C. arnoldi* són comparables als d'altres espècies d'amfibis amb rangs de distribució molt més grans. En aquest capítol es planteja que la fragmentació de l'hàbitat natural no va tenir efectes negatius en una escala de temps evolutiu, i que l'espècie ha pogut evolucionar gràcies a estratègies reproductives (per exemple, la selecció de parella o *mate choice*) per fer front a les poblacions de mida petita. No obstant això, en el capítol s'adverteix que la fragmentació natural de l'hàbitat ha de ser avaluat com un factor diferent de la pèrdua o degradació de l'hàbitat. L'efecte de tots dos factors ha de ser considerat de forma independent en la planificació de les estratègies de conservació d'una espècie en perill d'extinció. Els resultats d'aquest capítol, juntament amb els obtinguts al Capítol IV, suggereixen que ambdós sectors han de ser considerats com a dues unitats de gestió independents per a la conservació, tant in situ com ex situ.

A nivell ex situ, l’avaluació detallada en el Capítol VII mostra que l’estoc captiu actual s’ha iniciat i conté un percentatge mitjà-alt de la freqüència al·lèlica de les poblacions salvatges. Així, s’arriba a la conclusió que la diversitat genètica i representativitat de les poblacions captives és bona però no òptima. Es proposa que ha de ser incorporat nou material genètic a través de la introducció de nous individus no relacionats o del seu esperma. D'acord amb les unitats de maneig anteriorment definides (oriental i occidental), es suggereix mantenir dues línies de cria en captivitat diferents, recomanant evitar la fecundació creuada entre elles. A més, es recomana mantenir un programa ex situ obert que permeti un flux genètic continu de les poblacions salvatges a les poblacions captives per tal d’evitar en les successives generacions l’adaptació al captiveri.

2. DISCUSSIÓ GENERAL

El coneixement aportat en aquesta tesi doctoral és rellevant per a la conservació i gestió del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*). El coneixement de la biologia d’aquesta espècie és escàs, degut a la dificultat d’observar-la i estudiar-la en estat salvatge. Aquesta informació, però, és necessària per avaluar el risc d’extinció i determinar així una correcta gestió. En aquest cas, l’investigació genètica és molt útil per tal d’augmentar aquest coneixement, ajudant a omplir algunes llacunes importants de la dinàmica de les poblacions de l’espècie.

En moltes espècies amenaçades, les anàlisis genètiques no són una eina molt valuosa ja que aquestes espècies acostumen a presentar baixos llindars de variabilitat genètica, fet que aportarà poca informació per a la seva gestió (Lawrence 2008). Generalment, a mesura que una població disminueix la seva mida, la variabilitat genètica també minva. Això limita avaluar en profunditat aspectes sobre la biologia de l’espècie a escala contemporània, així com la seva història evolutiva.

Afortunadament, tot i que *C. arnoldi* és una espècie amenaçada i restringida a una àrea de distribució molt reduïda amb pocs efectius, ha retingut la variabilitat genètica necessària per a fer possibles estudis poblacionals detallats. És, per tant, una oportunitat excepcional per a fer un estudi en profunditat i obtenir informació molt valuosa per aquesta espècie. El nivell de variació genètica trobat en aquesta espècie ens permet examinar les seves poblacions a diferents escales temporals, i ens permet extrapolar la demografia històrica i actual de l’espècie, així com la viabilitat de les poblacions (estat de salut segons les característiques genètiques de les poblacions), entre d’altres. Aquestes informacions tindran una gran implicació en el tipus de gestió a seguir per tal d’afavorir la supervivència de l’espècie a llarg termini, i s’han de tenir en compte alhora de prendre decisions sobre la seva gestió in situ (per exemple, determinar les unitats de gestió), i ex situ (avaluar i dissenyar el programa de cria en captivitat).

La importància de conservar la variabilitat genètica d'aquesta espècie rau en poder conservar el seu potencial evolutiu així com permetre que investigacions futures puguin esbrinar encara més enigmes sobre el tritó del Montseny, allunyant-lo de l'extinció.

2.1. IMPLICACIONS EN LA CONSERVACIÓ

Els resultats moleculars donen suport a l'estatus de "en perill crític" establert per la IUCN per a aquesta espècie. La forta estructura de les poblacions, juntament amb les seves mides poblacionals efectives estimades, són resultats a tenir molt en compte a l'hora de definir les línies de gestió i conservació.

Definició de les unitats de conservació/maneig en l'espècie

Un dels objectius de la conservació d'espècies amenaçades és mantenir el seu potencial evolutiu (Frankel 1970; Frankel i Soulé 1981; Frankham 2010), mitjançant la priorització de les unitats mínimes de conservació, assegurant que la història evolutiva (i potencial evolutiu) de l'espècie es maximitzi, protegeixi i mantingui. La delimitació precisa de les unitats mínimes de gestió per aconseguir aquest objectiu és de vital importància però és un criteri àmpliament discutit.

Les espècies són la unitat taxonòmica bàsica tant per a la conservació com pel maneig de la biodiversitat, i és el primer pas alhora de discutir futures qüestions sobre biogeografia, ecologia, conservació o evolució (Vasconcelos 2010). Existeixen múltiples definicions d'espècie, però en gairebé totes elles s'interpreten les espècies com a llinatges evolutius. No obstant, en molts casos la diferenciació intraespecífica és tan elevada que s'ha de tenir en compte nivells inferiors alhora de definir els diferents llinatges evolutius.

El concepte de subespècie es troba a la interfície entre la sistemàtica i la genètica de poblacions, i representa una unitat d'organització biològica en zoologia que s'utilitza àmpliament en les disciplines de la taxonomia i biologia de la conservació. Aquest concepte va ser originalment concebut per a taxons amb una variació geogràfica dins de les espècies (poblacions al·lopàtriques), i amb diferenciació morfològica, sense tenir en compte l'estructura genètica. En canvi, la definició d'Unitats Evolutives Significatives (ESUs) ja contemplava l'objectiu de capturar la història evolutiva dins d'una espècie. De fet Moritz (1994) postulava que les poblacions primer divergien en ESUs, com a conseqüència de la deriva genètica, però presentaven poca o limitada diferenciació fenotípica. Quan aquesta diferenciació morfològica apareixia ja es definia com a subespècie.

En conclusió, les poblacions al·lopàtriques d'una espècie poden representar una etapa incipient de la diferenciació, és a dir, poden estar en un procés d'especiació independent, amb un mínim flux de gens entre elles, de manera que comprenen grups evolutius diferents (Gompert *et al.* 2006; Joyce *et al.* 2009; Zink 2004). Amb el temps evolutiu, aquestes esdevindran noves espècies. Les poblacions són dinàmiques i estan contínuament evolucionant. Per sota del llindar d'espècie, en un tall en la branca de l'arbre de la vida, les subespècies o ESUs es troben enmig d'un camí continu de diferenciació de les seves poblacions comprenent a dins grups reproductius dins d'una espècie. En el procés d'un llinatge d'especiació al·lopàtrica, les subespècies o ESUs representen l'estadi prematur de diferenciació amb l'adquisició d'unes o altres propietats (Figura 10).

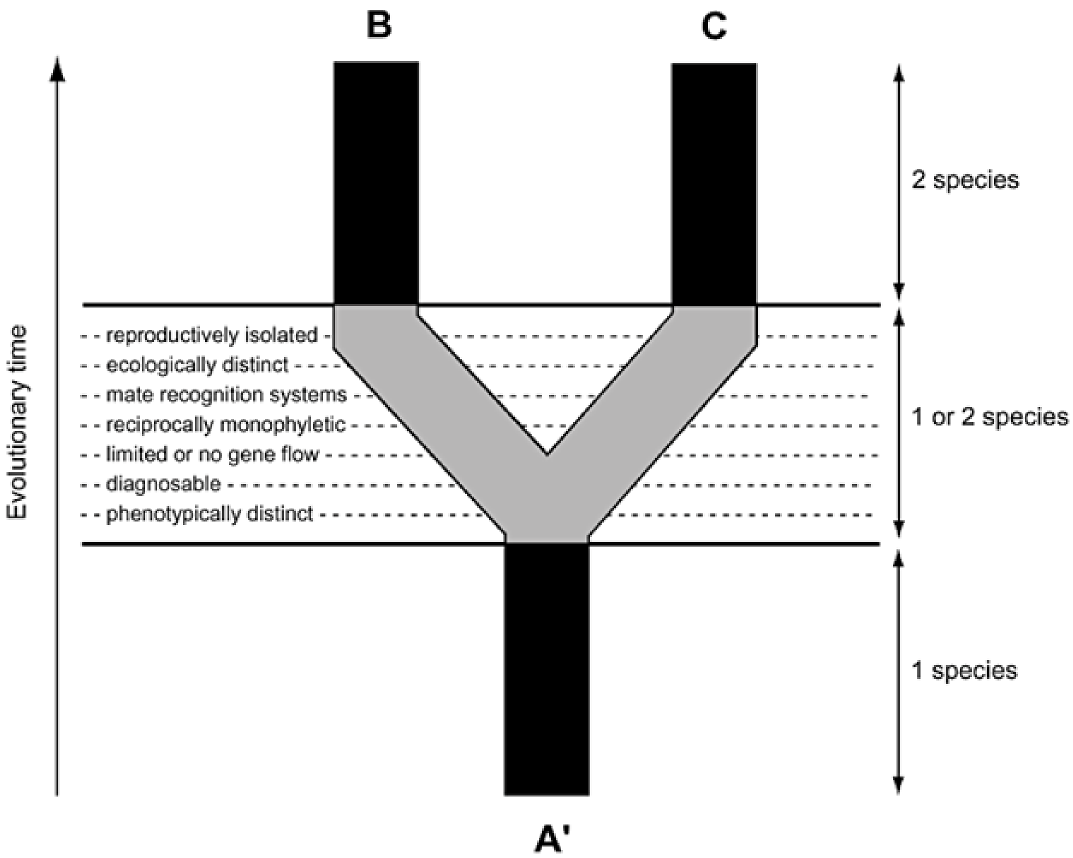


Figura 10. Procés de formació de dues espècies (B i C) a partir d'un únic llinatge ancestral (A) segons Braby *et al.* (2012). La zona grisa representa el temps durant el qual els llinatges fills adquireixen propietats diferents. El nombre d'espècies representats a dalt i a baix de les barres negres (zona negre) és clar, en el dos casos. En canvi, en la zona grisa, en els processos incipients de diferenciació de les dues espècies, hi ha més controvèrsia, i és on estaries reconegudes les subespècies o ESUS.

Avui en dia, l'actual definició de subespècies al·lopàtriques ja s'utilitza tenint en compta les dades moleculars. Així doncs aquest terme es solapa àmpliament amb els criteris per considerar ESUs: han d'estar reproductivament isolades d'altres unitats poblacionals, i han de representar un important component evolutiu per al llegat de l'espècie (Waples 1995).

En aquests moments, doncs, s'hauria de reconèixer les ESUs com a subespècie? La resposta a aquesta qüestió dependrà probablement del taxó concret, i l'interès final. Per a la biologia de la conservació, al final la qüestió rau en: aquestes poblacions diferenciades (i per tant el seu potencial evolutiu) mereixen estatus taxonòmic formal per al reconeixement en els programes de conservació?

Tot i que recentment en molts àmbits el dos conceptes es sinonimitzen, en la biologia de la conservació, la utilització del terme subespècie encara és molt controvertit:

- No hi ha un consens per a delinear les unitats infraespecífiques de conservació. Com s'haurien de definir els llindars? És molt difícil delimitar un llindar entre subespècie i espècie. Si una subespècie presenta diferències morfològiques i genètiques, perquè aleshores no és considerada espècie?
- Depèn molt del criteri dels taxònoms; hi ha dues tendències, el *splittitng* i el *lumping*: la tendència en separar l'espècie en dos o més subespècies (*splitting*), o bé la tendència en mantenir-los en una mateixa espècie (*lumping*) fins que hi hagi prou evidències per descriure-ho com a espècies diferents; és per tant una decisió taxonòmica. En alguns casos, a més, hi pot haver inconsistència entre experts.
- Tot i que les subespècies poden ser objecte de conservació (Braby *et al*. 2012), la falta de validació d'aquestes pot dificultar a l'administració i organitzacions conservacionistes la seva aprovació per a ser incloses en els llistats de conservació (Gippoliti i Amori 2007; Haig *et al.* 2006; James 2010; Stanford 2001). Per exemple, si bé les avaluacions de conservació de la IUCN és obligatori per a les espècies, la inclusió de subespècies depèn de l'actitud i el coneixement d'especialistes en diferents taxons i en diferents regions.

En aquesta tesi, que té un objectiu clar d'elaborar recomanacions per a la conservació i gestió d'aquesta espècie, s'ha optat per la terminologia ESU per definir la unitat de gestió, a la espera de la possibilitat que en un futur es pugui fer una avaluació de la situació i treure conclusions taxonòmiques. Si es té en compte aquestes línies evolutives alhora d'establir les estratègies de gestió per a aquesta espècie, s'afavorirà el manteniment de la variabilitat genètica d'aquesta espècie així com el seu potencial evolutiu.

Les poblacions de *C. arnoldi* estan genèticament molt estructurades, amb una diferenciació genètica significativa entre sectors (oriental més divers que l'occidental). Els dos sectors compleixen els criteris d'estar reproductivament aïllats (aïllament per distància): a) estan geogràficament aïllats, i b) no hi ha cap indici de flux genètic entre ells i aquests estan ben diferenciats genèticament. A més a més, hi ha diferències morfològiques clares entre individus dels dos sectors, fet que podria indicar una possible adaptació local a cadascun dels dos sectors.

Així doncs, segons l' estructura poblacional de *C. arnoldi*, s'haurien de considerar dues ESUs diferents: les poblacions del sector oriental i les poblacions del sector occidental.

Vulnerabilitat de l'espècie

És àmpliament reconegut que la determinació de la grandària efectiva de la població genètica (N_e) és més important que mesurar la mida del cens (N_c) en les poblacions salvatges (Beebee i Griffiths 2005). De fet, la mida efectiva de la població (N_e) és el paràmetre d'interès primari per als estudis de genètica de conservació, ja que és un bon indicador de la viabilitat d'aquesta a llarg termini perquè reflecteix amb precisió el potencial evolutiu d'una població. Les mesures de conservació d'espècies amenaçades han de tenir en compte aquest tipus de vulnerabilitat poblacional, sobretot en especies amb poblacions altament aïllades.

Generalment, les estimes de N_e amb mètodes demogràfics solen ser difícils; en canvi, les estimes per mètodes genètics permeten obtenir valors N_e fiables (Palstra i Ruzzante 2008). S'ha suggerit que per tal que una espècie o població sigui viable a llarg termini ha de tenir un N_e mínim de 500 (Franklin 1980; Soulé 1980). Valors de N_e de menys de 50 en poblacions aïllades són de gran preocupació, ja que aquestes poblacions tindrien una major probabilitat d'extinció com a resultat dels efectes genètics (Allendorf i Luikart 2007; Hurtado *et al.* 2012). No obstant, aquestes assumpcions no són aplicables a tots els organismes, ja que la N_e depèn àmpliament de la biologia de les determinades espècies. Així, N_e inferiors a 100 són comuns en amfibis (Beebee i Griffiths 2005; Funk *et al.* 1999).

En el cas de *Calotriton arnoldi*, les estimes demogràfiques realitzades per Amat i Carranza (2005) ja mostraven valors poblacionals petits. Els resultats genètics obtinguts en aquesta tesi doctoral corroboren els censos demogràfics estimats, amb valors d'estimes poblacions efectives molt reduïdes per a totes les poblacions conegudes d'aquesta espècie. Aquest fet suggereix que la situació d'aquestes és preocupant.

Generalment, les poblacions amb N_e molt reduïdes són susceptibles a l'esgotament genètic a través de la deriva i endogàmia, amb conseqüències adverses per a la seva viabilitat (Frankham

2005; Palstra i Ruzzante 2008). En aquest cas, no obstant, s'han obtingut nivells de diversitat genètica elevats tenint en compte l'extensió i demografia de l'espècie, i no s'ha detectat evidències d'endogàmia. Una possible explicació a la manca de correspondència entre la mida efectiva petita i la baixa endogàmia pot ser degut a l'estratègia reproductiva de l'espècie. Les femelles promíscues en diverses espècies, i entre ells els urodels i *C. arnoldi*, podrien evitar l'endogàmia mitjançant l'emmagatzematge d'esperma (*sperm storage*) (Alonso 2013; Bretman *et al.* 2009). Aquests mecanismes poden haver evitat que, tot i el reduït rang de distribució i la fragmentació de les seves poblacions, aquesta espècie presenti signes d'esgotament genètic. Així, pel que fa al manteniment de la diversitat genètica, les mides petites de població efectiva no necessàriament representen un problema, ja que pot haver-hi altres tipus de mecanismes de reproducció o comportament que poden contrarestar els efectes de la deriva genètica (Allentoft i O'Brien 2010).

No obstant, les N_e petites són potencialment més vulnerables al risc d'extinció, ja no tant com a resultat de la deriva genètica, sinó a causa de la impossibilitat de sobreviure esdeveniments estocàstics ambientals (per exemple, malalties o desastres naturals) o estocasticitat demogràfica (per exemple, variacions aleatòries en la proporció de sexes, la mortalitat o reproducció), i més encara en espècies amb poblacions isolades.

D'altra banda, en poblacions aïllades, però, cal diferenciar entre fragmentació natural de l'hàbitat i pèrdua d'aquest. En la majoria d'espècies, la fragmentació de l'hàbitat comporta una pèrdua d'aquest, provocant els signes d'esgotament genètic i endogàmia anteriorment esmenats. No obstant, aquests dos conceptes no són sinònims. En el cas de *C. arnoldi*, si bé la fragmentació de l'hàbitat sembla haver contribuït a mantenir els nivells genètics de l'espècie, la pèrdua d'hàbitat sí que pot comportar una greu amenaça per a la supervivència d'aquesta espècie.

La viabilitat a llarg termini de les poblacions del tritó del Montseny és molt preocupant ja que:

- Aquesta espècie està restringida a una àrea geogràfica molt petita (<8 km^2), susceptible a un alt risc d'extinció.
- El seu hàbitat és molt vulnerable a l'acció humana i canvi climàtic, fet que podria comportar una pèrdua d'hàbitat.
- Les poblacions estan fragmentades i isolades entre elles i presenten valors d'estimes poblacionals efectius molt petits, fets que, tot i que no comporten un problema de pèrdua de variabilitat genètica, deixa a cadascuna d'elles en una situació alarmant per a la supervivència.

Per tot això, es confirma la fragilitat de l’espècie i la seva classificació com a críticament amenaçada (IUCN).

Gestió de les poblacions salvatges i captives

L’encreuament de les dues unitats de conservació (*outcrossing*) seria una acció que podria ajudar a augmentar la diversitat genètica (Frankham et al. 2010). No obstant això, en aquest cas no es recomana per dues raons principals: a) la importància de mantenir els dos grups evolutius, i b) el potencial amenaçador de les poblacions existents a causa de la depressió per exogàmia (*outbreeding depression*, OD) (Allendorf i Luikart 2007). Sovint, les directrius de conservació existents se centren en mantenir un alt nivell de diversitat genètica en lloc de mantenir el potencial evolutiu de les poblacions (Allentoft i O’Brien 2010). Actualment, recents estudis de biologia de la conservació ja indiquen la importància de maximitzar el potencial evolutiu i el reconeixent de la microevolució com a factor de persistència de la població en entorns canviants (Rice i Emery 2003; Sgrò et al. 2011). El potencial evolutiu de *C. arnoldi* rau no només dins de l'espècie en el seu conjunt, sinó també dins de cada sector. Per tant, les estratègies de conservació a seguir s'han d’orientar en assegurar que no es perdi aquest potencial evolutiu i la diversitat genètica present (Hoffman i Blouin 2004), evitant l’*outcrossing* d'aquests dos grups evolutius. D'altra banda, les poblacions aïllades durant més de 500 anys poden presentar modestes o altes probabilitats d'OD (Frankham et al. 2011). Tenint en compte que l'aïllament dels dos sectors, probablement, es va dur a terme fa més de 250.000 anys (Amat i Carranza 2007a), es suggereix la possibilitat que aquesta espècie pugui presentar OD. Tenint en compte que altres autors van documentar OD per a altres amfibis i que representa una preocupació legítima (Sagvik et al. 2005; Sherman et al. 2008), no sembla prudent considerar l’*outcrossing* abans d'obtenir informació sobre l’OD. A més, abans de realitzar qualsevol actuació, és important avaluar si les poblacions orientals i occidentals han adquirit una adaptació local i estudiar-ne el potencial d’intercanviabilitat ecològica (Blank et al. 2013; Kraaijeveld-Smit et al. 2005), fet que podria estar passant en el tritó del Montseny al presentar diferències morfològiques patents entre sectors. Per tant, per totes aquestes raons expressades anteriorment, es suggereix que ambdós sectors han de ser considerats com a unitats de gestió independents per a la conservació, tan a nivell in situ com ex situ. A més a més, per al maneig genètic de poblacions captives, també es recomana tenir en compte l’estructura genètica trobada dins de cada sector.

2.2. FUTURES LÍNIES DE RECERCA

Aquest estudi ha millorat en gran mesura el coneixement sobre la diversitat genètica i estructura poblacional del tritó del Montseny. Esforços de mostreig genètics s'han de mantenir en els propers anys i durant un llarg període de temps per tal de detectar les fluctuacions demogràfiques i genètiques.

El seguiment i el manteniment d'altes mides efectives en les poblacions i de la variabilitat genètica és molt important per a la conservació d'espècies amenaçades, ja que aquests factors tenen el potencial de millorar l'adaptació evolutiva a llarg termini en resposta a l'estocasticitat ambiental (Frankham *et al.* 2010). És important assenyalar aquí que les estimacions de la grandària efectiva de la població obtinguda en aquest estudi han de ser tractats com aproximacions, ja que són estimes puntuals, d'una generació. És important mantenir aquests estudis d'estimes poblacionals efectives al llarg de diverses generacions per tal de detectar les fluctuacions temporals en la mida de la població i les tendències. L'estudi continuat de N_e ens ajudarà doncs a determinar si la població és estable, o bé està disminuint o augmentant. Aquesta informació serà particularment valuosa per al disseny del pla de gestió de la conservació d'aquesta espècie en perill crític.

En relació a la gestió ex situ, un problema important en que s'enfronten els programes de cria en captivitat és que les poblacions captives es poden veure afectades per fenòmens com ara l'adaptació genètica a la captivitat, ja que s'esbiaixa la selecció natural (es controlen les malalties, es seleccionen determinades parelles i s'evita la competència amb altres espècies entre d'altres). Per altra banda, a mesura que augmenta el número de generacions, poden aparèixer problemes de depressió per endogàmia (els individus estaran emparentats, i amb això, pot haver-hi un augment en la probabilitat que al·lels recessius deleteris es presentin i redueixin la fecunditat i supervivència). A més a més, en el moment de la creació de l'estoc fundador es dóna una pèrdua de diversitat genètica, ja que el pool genètic de la població salvatge es trobarà només representat pels individus fundadors, fet que podria provocar pèrdues del potencial evolutiu de l'espècie (Frankham *et al.* 2010). Si no es fa un maneig adequat de les poblacions captives, es podria donar una pèrdua de diversitat genètica existent en l'estoc captiu, fet que podria provocar una diferenciació entre la població captiva i la salvatge, que podria tenir efectes perjudicials en el moment d'una reintroducció. Per tot això és important que les cohorts posteriors siguin monitoritzades a llarg termini. Es suggereix la construcció d'un sistema obert que permet que el flux genètic continu de les poblacions salvatges a les poblacions captives. El coneixement previ de la seva aportació genètica dels nous individus salvatges que s'incorporin a l'estoc captiu és essencial, i per tant és convenient avaluar-los genèticament abans de ser incorporats al programa ex situ, per tal de seleccionar els més òptims i optimitzar al màxim l'aparellament entre fundadors.

Per últim, l'objectiu principal de qualsevol programa de reintroducció d'espècies amb fins de conservació ha de ser establir una població salvatge autosostinguda, que es defineix com aquella població mínima viable (PMV) amb una elevada probabilitat de persistència fent front a l'extinció dels desastres naturals, demogràfics, o bé a l'estocasticitat genètica o ambiental. L'avaluació de l'èxit dels programes de reintroducció requereix bones dades de seguiment posterior a l'alliberament a llarg termini (Scott i Carpenter 1987), ja que aquests permeten modelitzar i fer l'anàlisi de viabilitat poblacional (PVA; Beissinger i Westphal 1998). Així doncs, també es suggereix fer el seguiment genètic de les reintroduccions del tritó del Montseny a les àrees òptimes seleccionades i calcular-ne les PMV, és a dir, el nombre mínim d'individus de les poblacions reintroduïdes que els permeti retenir la diversitat genètica i el potencial evolutiu per tal de sobreviure a mitjà i llarg termini, i adaptar-se a futurs canvi ambientals (Frankham *et al.* 2014).

Lots of people talk to animals. Not very many listen, though. That's the problem!

Benjamin Hoff

1. Els resultats moleculars a partir del Cyt *b* i RAG1 confirmen que no hi ha cap senyal de flux genètic entre les dues espècies del gènere *Calotriton*, tot i ser ecològicament similars i geogràficament molt properes. Es corrobora la validesa taxonòmica de les dues espècies i es refuta que hi hagi hagut hibridació entre *C. asper* i *C. arnoldi* posterior al procés de vicariància.

2. En aquesta tesi, es descriuen quinze loci polimòrfics per a *C. arnoldi* que, juntament amb els nou loci desenvolupats anteriorment per *C. asper* i que amplifiquen amb èxit en *C. arnoldi*, proporcionen una eina poderosa per dur a terme estudis de genètica de conservació.

3. Els nivells de diversitat genètica de *C. arnoldi* són comparables als d'altres espècies d'amfibis amb rangs de distribució molt més grans.

4. Les xarxes haplotípiques, els resultats de l'AMOVA i IBD, i nivells d'F_{ST} basats en gens mitocondrials, nuclears de còpia única i microsatèl·lits, mostren una elevada estructura genètica de les poblacions de tritó del Montseny, tot i el seu reduït rang de distribució.

5. Les anàlisis moleculars suggereixen dos grups poblacionals geogràficament diferenciats, amb absència de flux genètic entre ells, els sectors oriental i occidental, sent el sector oriental més divers genèticament que l'occidental.

6. Existeixen diferències morfològiques entre els individus del sector oriental i occidental, tant a nivell morfomètric com de patrons de pigmentació de la pell.

7. Les dades moleculars i morfològiques, juntament amb la distribució geogràfica, suggereixen l'existència de dues unitats evolutives significatives (ESUs), el sector oriental i el sector occidental. Per a la conservació i gestió d'aquesta espècie es recomana el maneig dels dos sectors per separat.

8. Dins de cada sector, les poblacions A3 i B3, per al sector oriental i occidental respectivament, queden clarament diferenciades de la resta. La població B3 presenta una situació crítica pels seus baixos nivells de diversitat genètica i baixa mida efectiva estimada (Ne<10).

9. Les estimes de la mida poblacional efectiva suggereixen valors críticament baixos per a totes les poblacions (Ne<100); no obstant, no s'ha trobat evidència d'alts nivells de consanguinitat entre els individus dins de les poblacions.

10. Es suggereix que la fragmentació de l'hàbitat natural d'aquesta espècie no va tenir efectes negatius en una escala de temps evolutiu, i que l'espècie ha pogut sobreviure gràcies a

estratègies reproductives (per exemple, la selecció de parella o *mate choice*) per fer front als problemes que afronten les poblacions de mida petita.

11. Es confirma l'estat de conservació de l'espècie com a críticament amenaçada, i s'adverteix que la fragmentació natural de l'hàbitat ha de ser avaluat com un factor diferent de la pèrdua o degradació de l'hàbitat, en la planificació de les estratègies de conservació d'aquesta espècie.

12. Es recomana dur a terme un monitoratge a llarg termini de les poblacions, per tal de detectar qualsevol fluctuació demogràfica o genètica que pugui agreujar l'estat de conservació d'aquestes poblacions.

13. Es suggereix mantenir dues línies de cria en captivitat diferents, en concordança amb les ESUs anteriorment definides, i evitar la fecundació creuada entre elles, per tal de conservar el potencial evolutiu de l'espècie, i evitar possibles problemes de depressió per exogàmia.

14. La diversitat genètica i representativitat de les poblacions captives és bona però no òptima. L'estoc captiu actual conté el 82% dels al·lels presents en les poblacions salvatges, sent aquest el 74% pel sector oriental i el 78% per l'occidental. L'actual diferenciació genètica entre les poblacions captives i les salvatges està al voltant del 5-7%, excedint el 2.5% desitjat per tal d'obtenir una òptima representativitat.

15. Es proposa que ha de ser incorporat nou material genètic a través de la introducció de nous individus no relacionats o del seu esperma a través de femelles gràvides, seguint les propostes basades en els resultats genètics obtinguts.

16. Es recomana mantenir un programa ex situ obert que permeti un flux genètic continu de les poblacions salvatges a les poblacions captives per tal d'evitar, en les successives generacions, l'adaptació al captiveri.

17. Les dades obtingudes podran servir de referència en la monitorització de la variació genètica de les poblacions naturals i captives, necessària per a la conservació i gestió d'aquesta espècie.

Those who wish to pet and baby wild animals "love" them. But those who respect their natures and wish to let them live normal lives, love them more

Edwin Way Teale

X. BIBLIOGRAFIA

Alonso M (2013) *Influència de l'edat en la cria en captivitat del Tritó del Montseny (Calotriton arnoldi)*. Treball final de carrera, Universitat de Lleida.

Allendorf FW, Luikart G (2007) *Conservation and the genetics of populations.* Blackwell, Oxford.

Allentoft M, O'Brien J (2010) Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: a review. *Diversity* **2**, 47-71.

Amat F (2004) Distribució del tritó pirinenc (*Euproctus asper*) a la conca de la Tordera del Parc Natural del Montseny. Fase 2004, pp. 90-93. Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona, Barcelona.

Amat F, Carranza S (2005) Estudi demogràfic del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) al Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny, pp. 85-86. Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona, Barcelona.

Amat F, Carranza S (2006) Aproximació a l'evolució i biologia del tritó del Montseny. In: *Monografies del Montseny* (ed. Pladevall A), pp. 165-193. El Ciervo, Barcelona.

Amat F, Carranza S (2007a) Conservació del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) en l'àmbit del Parc Natural del Montseny, pp. 1-67. Forestal Catalana i Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya, Barcelona.

Amat F, Carranza S (2007b) Projecte de conservació del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) en l'àmbit del Parc Natural del Montseny, pp. 1-127. Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona i Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya, Barcelona.

Amat F, Carranza S (2009) Projecte de conservació del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) a l'àmbit del PN-MaB del Montseny, pp. 88-89. Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona, Barcelona.

Amat F, Carranza S (2011) Opportunistic predation of salamandra larvae (*Salamandra salamandra terrestris*) by the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). *Butlletí de la Societat Catalana Herpetologia* **19**, 66 - 69.

Amat F, Carranza S, Valbuena-Ureña E, Carbonell F (2014) Saving the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) from extinction: an assessment of eight years of research and conservation. In: *FroLog*, pp. 55 - 57.

AmphibiaWeb (2015) *Information on amphibian biology and conservation.* AmphibiaWeb, Berkeley, California. http://amphibiaweb.org. Consultat: 24/05/2015

Angulo A, Rueda-Almonacid JV, Rodríguez-Mahecha JV, La Marca E (2006) *Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo Nº 2.* Panamericana Formas e Impresos S.A., Bogotá, Colombia.

Barber J, Guinart D, Solórzano S, Vicens N (2014) Pla de conservació del Parc Natural del Montseny. Reserva de la Biosfera, p. 561. Diputació de Barcelona, Barcelona.

Baucells J, Camprodon J, Ordeix M (1998) *Fauna vertebrada d'Osona.* Lynx Edicions, Barcelona.

Beebee TJC, Griffiths RA (2005) The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation* **125**, 271-285.

Beissinger SR, Westphal MI (1998) On the use of demographic models of population viability in endangered species management. *The Journal of Wildlife Management* **62**, 821-841.

Blank L, Sinai I, Bar-David S, Peleg N, Segev O, Sadeh A*, et al.* (2013) Genetic population structure of the endangered fire salamander (*Salamandra infraimmaculata*) at the southernmost extreme of its distribution. *Animal Conservation* **16**, 412-421.

Bosch J (2003) Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe* **16**, 56-73.

Bosch J, Martínez-Solano I, García-París M (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* **97**, 331-337.

Boulenger G (1917) Les batraciens urodèles rapportés au genre *Euproctus*; leurs rapports éthologiques et phylogénetiques. *Comptes Rendus de l'Académie ses Sciences Paris* **164**, 709-712.

Braby MF, Eastwood R, Murray N (2012) The subspecies concept in butterflies: has its application in taxonomy and conservation biology outlived its usefulness? *Biological Journal of the Linnean Society* **106**, 699-716.

Bretman A, Newcombe D, Tregenza TOM (2009) Promiscuous females avoid inbreeding by controlling sperm storage. *Molecular Ecology* **18**, 3340-3345.

Carbonell F, Alonso M, Larios R, Obon E, Valbuena-Ureña E (2011) Conservació del tritó del Montseny. *Ponències. Revista del Centre d'Estudis de Granollers*, 11-30.

Carbonell F, Alonso M, Larios R, Obon E, Valbuena-Ureña E, Amat F (2014a) Montseny Brook Newt *ex situ* conservation program. In: *Amphibian Ark Newsletter*, pp. 11-12.

Carbonell F, Obon E, Alonso M, Valbuena-Ureña E, Larios R (2010) Reserva genètica i cria en captivitat del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*). In: *Activitats realitzades pel centre de fauna de Torreferrussa. Informe inèdit.* (eds. Such-Sanz À, Mayné J, Pomarol M), pp. 54 - 69. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural - Forestal Catalana, S.A., Barcelona.

Carbonell F, Obon E, Alonso M, Valbuena-Ureña E, Larios R (2014b) Reserva genètica i cria en captivitat del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*). In: *Activitats realitzades pel centre de fauna de Torreferrussa. Informe inèdit.* (eds. Such-Sanz À, Mayné J, Pomarol M). Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural - Forestal Catalana, S.A., Barcelona.

Carranza S, Amat F (2005) Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula. *Zoological Journal of the Linnean Society* **145**, 555-582.

Carranza S, Martínez-Solano I (2009) *Calotriton arnoldi.* The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.1. www.iucnredlist.org. Consultat: 9/4/2015

Caughley G (1994) Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology* **63**, 215-244.

Cushman SA (2006) Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation* **128**, 231-240.

Chambers GK, MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **126**, 455-476.

Despax R (1923) *Contribution à l'étude anatomique et biologique des batraciens urodèles du groupe des Euproctes*. Tesis doctoral.

Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 3166-3170.

Edmands S (2007) Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* **16**, 463-475.

Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* **16**, 551-558.

Fernández-Cebrián R (2011) *Estructura poblacional y demografía genética en poblaciones de trucha común (Salmo trutta) del Pirineo catalán*. Tesis doctoral, Universitat de Girona.

Fisher MC, Garner TWJ (2007) The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews* **21**, 2-9.

Frankel OH (1970) Variation - the essence of life. Sir William Macleay Memorial Lecture. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **95**, 158-169.

Frankel OH, Soulé ME (1981) *Conservation and Evolution.* Cambridge University Press, Cambridge.

Frankham R (1995) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* **29**, 305-327.

Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation* **126**, 131-140.

Frankham R (2010) Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* **143**, 1919-1927.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2010) *Introduction to conservation genetics.* 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR*, et al.* (2011) Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology* **25**, 465-475.

Frankham R, Bradshaw CJA, Brook BW (2014) Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* **170**, 56-63.

Franklin IR (1980) Evolutionary change in small populations. In: *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective* (eds. Soulé ME, Wilcox BA), pp. 135-149. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Frost DR (1985) *Amphibian species of the world: a taxonomic and geographical reference.* Allen Press, Lawrence, Kansas.

Funk WC, Tallmon DA, Allendorf FW (1999) Small effective population size in the long-toed salamander. *Molecular Ecology* **8**, 1633-1640.

García-González C (2012) *Variabilidad genética poblacional de anfibios en hábitats urbanos y rurales. Aplicaciones para la conservación*. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.

Gascon C, Collins JP, Moore RD, Church DR, McKay JE, Mendelson JRI*, et al.* (2007) *Amphibian conservation action plan.* IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom.

Gasser F (1975) *Recherches sur l'estatus microévolutif de deuxs amphibiens Urodèles, l'espèce pyrénéenne Euproctus asper Dugès et l'espèce paleartique Salamandra salamandra L.: proteines et groupes sériques, cycles sexuels des femelles et morphologie*. Tesis doctoral, Université de Toulouse.

Gilbert T (2011) *The sustainability of endangered species under intensive management: the case of the scimitarhorned oryx Oryx dammah*. Tesis doctoral, University of Southampton.

Gippoliti S, Amori G (2007) The problem of subspecies and biased taxonomy in conservation lists: the case of mammals. *Folia Zoologica* **56**, 113-117.

Glaw F, Köhler J (1998) Amphibian species diversity exceeds that of mammals. *Herpetological Review* **29**, 11-12.

Godinho R, Crespo EG, Ferrand N (2008) The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in a highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Molecular Ecology* **17**, 4670-4683.

Gompert Z, Nice CC, Fordyce JA, Forister ML, Shapiro AM (2006) Identifying units for conservation using molecular systematics: the cautionary tale of the Karner blue butterfly. *Molecular Ecology* **15**, 1759-1768.

Haig SM, Beever EA, Chambers SM, Draheim HM, Dugger BD, Dunham S*, et al.* (2006) Taxonomic considerations in listing subspecies under the U.S. Endangered Species Act. *Conservation Biology* **20**, 1584-1594.

Hoban S, Arntzen JW, Bertorelle G, Bryja J, Fernandes M, Frith K*, et al.* (2013) Conservation genetic resources for effective species survival (ConGRESS): bridging the divide between conservation research and practice. *Journal for Nature Conservation* **21**, 433-437.

Hoffman EA, Blouin MS (2004) Historical data refute recent range contraction as cause of low genetic diversity in isolated frog populations. *Molecular Ecology* **13**, 271-276.

Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, Böhm M, Brooks TM, Butchart SHM*, et al.* (2010) The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science* **330**, 1503-1509.

Howard SD, Bickford DP (2014) Amphibians over the edge: silent extinction risk of Data Deficient species. *Diversity and Distributions* **20**, 837-846.

Hurtado L, Santamaria C, Fitzgerald L (2012) Conservation genetics of the Critically Endangered Saint Croix ground lizard (*Ameiva polops* Cope 1863). *Conservation Genetics* **13**, 665-679.

IUCN, Conservation International and NatureServe (2008) *An analysis of amphibians on the 2008 IUCN Red List.* www.iucnredlist.org/amphibians. Consultat: 24/5/2015

James FC (2010) Avian subspecies: Introduction. *Ornithological Monographs* **67**, 1-5.

Jensen J, Camp C (2003) Human exploitation of amphibians: direct and indirect impacts. In: *Amphibian Conservation*, pp. 199-213, Smithsonian Institution, Washington.

Joyce DA, Dennis RLH, Bryant SR, Shreeve TG, Ready JS, Pullin AS (2009) Do taxonomic divisions reflect genetic differentiation? A comparison of morphological and genetic data in *Coenonympha tullia* (Müller), Satyrinae. *Biological Journal of the Linnean Society* **97**, 314-327.

Kats LB, Ferrer RP (2003) Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions* **9**, 99-110.

Köhler J, Vieites DR, Bonett RM, García FH, Glaw F, Steinke D*, et al.* (2005) New amphibians and global conservation: a boost in species discoveries in a highly endangered vertebrate group. *BioScience* **55**, 693-696.

Kraaijeveld-Smit FJL, Beebee TJC, Griffiths RA, Moore RD, Schley L (2005) Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. *Molecular Ecology* **14**, 3307-3315.

Kühnel S, Reinhard S, Kupfer A (2010) Evolutionary reproductive morphology of amphibians: an overview. *Bonn Zoological Bulletin* **57**, 119-126.

Lacy R, Vargas A (2004) Informe sobre la gestión genética y demográfica del programa de cría para la conservación del lince Ibérico: escenarios, conclusiones y recomendaciones **11**.

Lacy RC (2009) Stopping evolution: genetic management of captive populations. In: *Conservation genetics in the age of genomics* (eds. Amato G, DeSalle R, Ryder OA, Rosenbaum HC), pp. 58 - 81. Columbia University Press, New York.

Lawrence HA (2008) *Conservation genetics of the world's most endangered seabird, the Chatham Island tāiko (Pterodroma magentae)*. Tesis doctoral.

Leus K (2011) Captive breeding and conservation. *Zoology in the Middle East* **54**, 151-158.

Leus K, Lacy RC (2009) Genetic and demographic management of conservation breeding programmes oriented towards reintroduction. In: *Iberian Lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach* (eds. Vargas A, Breitenmoser C, Breitenmoser U), pp. 75-84. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.

Li WH (1997) *Molecular evolution.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* **11**, 2453-2465.

Martel A, Blooi M, Adriaensen C, Van Rooij P, Beukema W, Fisher MC*, et al.* (2014) Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* **346**, 630-631.

Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Blooi M, Bert W, Ducatelle R, Fisher MC*, et al.* (2013) Batrachochytrium salamandrivorans sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 15325-15329.

Martínez-Silvestre A, Amat F, Bargalló F, Carranza S (2011) Incidence of pigmented skin tumors in a population of wild Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). *Journal of Wildlife Diseases* **47**, 410-414.

Martínez-Silvestre A, Amat F, Carranza S (2014) Natural incidence of body abnormalities in the Montseny newt, *Calotriton arnoldi* Carranza and Amat, 2005. *Herpetology Notes* **7**, 277-279.

Martínez MLM (2014) *Evaluación de la diversidad genética y estructura poblacional del berberecho Cerastoderma edule mediante marcadores microsatélite y de ADN mitocondrial*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña.

Montori A, Campeny R (1991) Situación actual de las poblaciones de tritón pirenaico *Euproctus asper* en el macizo del Montseny. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* **2**, 10-12.

Montori A, Llorente GA (2014) Tritón pirenaico – *Calotriton asper* (Dugès, 1852). In: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados* eds. Salvador A, Martínez-Solano I), p. 28. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Montori A, Pascual X (1981) Nota sobre la distribución de *Euproctus asper* (Dugés, 1852) en Cataluña: I. Primera localidad para el macizo del Montseny. *Publicaciones del Departamento de Zoología* **6**, 85-88.

Moritz C (1994) Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution* **9**, 373-375.

Obon E, Carbonell F, Valbuena-Ureña E, Alonso M, Larios R, Fernández-Beaskoetxea S*, et al.* (2013) Chytridiomycosis surveillance in the critically endangered Montseny brook newt, *Calotriton arnoldi*, northeastern Spain. *The Herpetological Journal* **23**, 237-240.

Palstra FP, Ruzzante DE (2008) Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology* **17**, 3428-3447.

Pechmann JH, Wilbur HM (1994) Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica* **50**, 65-84.

Peñuelas J, Boada M (2003) A global change-induced biome shift in the Montseny mountains (NE Spain). *Global Change Biology* **9**, 131-140.

Piña S (2014) *Biologia y Conservación del Ferreret (Alytes muletensis)*. Tesis doctoral, Universitat de les Illes Balears.

Pleguezuelos JM (2002) Las especies introducidas de anfibios y reptiles. In: *Atlas y Libro Rojo de los anfibios y reptiles de España* (eds. Pleguezuelos JM, Márquez R, Lizana M), pp. 501-532. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española, Madrid.

Price Stephen J, Garner Trenton WJ, Nichols Richard A, Balloux F, Ayres C, Mora-Cabello de Alba A*, et al.* (2014) Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. *Current Biology* **24**, 2586-2591.

Primack RB, Bacon EE (2011) Evolution and biodiversity conservation. In: *Grzimek's animal life encyclopedia: evolution* (ed. Hutchins M), pp. 335-345. Gale, Detroit.

Rice KJ, Emery NC (2003) Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1**, 469-478.

Roelants K, Gower DJ, Wilkinson M, Loader SP, Biju SD, Guillaume K*, et al.* (2007) Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 887-892.

Sagvik J, Uller T, Olsson M (2005) Outbreeding depression in the common frog, *Rana temporaria*. *Conservation Genetics* **6**, 205-211.

Scott JM, Carpenter JW (1987) Release of captive-reared or translocated endangered birds: what do we need to know? *Auk* **104**, 544-545.

Sgrò CM, Lowe AJ, Hoffmann AA (2011) Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary Applications* **4**, 326-337.

Sherman CDH, Wapstra E, Uller T, Olsson M (2008) Males with high genetic similarity to females sire more offspring in sperm competition in Peron's tree frog Litoria peronii. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**, 971-978.

Sherwin WB, Timms P, Wilcken J, Houlden B (2000) Analysis and conservation implications of koala genetics. *Conservation Biology* **14**, 639-649.

Snyder NFR, Derrickson SR, Beissinger SR, Wiley JW, Smith TB, Toone WD*, et al.* (1996) Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conservation Biology* **10**, 338-348.

Sodhi NS, Bickford D, Diesmos AC, Lee TM, Koh LP, Brook BW*, et al.* (2008) Measuring the meltdown: drivers of global amphibian extinction and decline. *PLoS ONE* **3**, e1636.

Soulé ME (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective* (eds. Soulé ME, Wilcox BA), pp. 151-170. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Stanford C (2001) The subspecies concept in primatology: the case of mountain gorillas. *Primates* **42**, 309-318.

Steinfartz S, Hwang UW, Tautz D, Öz M, Veith M (2002) Molecular phylogeny of the salamandrid genus *Neurergus*: evidence for an intrageneric switch of reproductive biology. *Amphibia-Reptilia* **23**, 419-431.

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL*, et al.* (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**, 1783-1786.

Temple HJ, Cox NA (2009) *European red list of amphibians.* Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

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

Vasconcelos R (2010) *Integrative approaches to the systematics and conservation of the reptiles of the Cape Cerde islands*. Tesis doctoral, Universidade do Porto.

Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Köhler J, Glaw F, Vences M (2009) Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 8267-8272.

Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* **34**, 275-305.

Wake DB (1991) Declining amphibian populations. *Science* **253**, 860.

Wake DB (2012) Facing extinction in real time. *Science* **335**, 1052-1053.

Wan Q-H, Wu H, Fujihara T, Fang S-G (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* **25**, 2165-2176.

Wang X, Tan X, Zhang P, Zhang Y, Xu P (2014) Recombination-activating gene 1 and 2 (RAG1 and RAG2) in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Biosciences* **39**, 849-858.

Waples RS (1995) Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. *American Fisheries Society Symposium* **17**, 8-17.

Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibáñez R, Salas AW, Cedeño JR*, et al.* (2001) Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* **15**, 1213-1223.

Zhang P, Papenfuss TJ, Wake MH, Qu L, Wake DB (2008) Phylogeny and biogeography of the family Salamandridae (Amphibia: Caudata) inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**, 586-597.

Zink RM (2004) The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **271**, 561-564.

Zippel K, Johnson K, Gagliardo R, Gibson R, McFadden M, Browne R*, et al.* (2011) The Amphibian Ark: a global community for ex situ conservation of amphibians. *Herpetological Conservation and Biology* **6**, 340-352.

But, about that, the last word has not yet been spoken

Helfer i Schlottke, 1935

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
Unitat de Zoogia

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona