



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departament de Biologia Evolutiva,
Ecologia i Ciències Ambientals

**El uso de herramientas moleculares no invasivas
para la detección de poblaciones del tritón del
Montseny (*Calotriton arnoldi*)**

Autor:

Sergio Alcalá Sevilla



Directores/Tutores:

Cesc Múrria i Farnós

Joan Gomà Martínez

Màster en Ecologia, Gestió i Restauració del Medi Natural

Noviembre, 2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departament de Biologia Evolutiva,
Ecologia i Ciències Ambientals

**El uso de herramientas moleculares no invasivas
para la detección de poblaciones del tritón del
Montseny (*Calotriton arnoldi*)**

Autor:

Sergio Alcalá Sevilla

		
Firma Autor: Sergio Alcalá Sevilla	Firma Director/Tutor: Cesc Múrria i Farnós	Firma Director/Tutor: Joan Gomà Martínez

Directores/Tutores:

Cesc Múrria i Farnós

Joan Gomà Martínez

Màster en Ecologia, Gestió i Restauració del Medi Natural

Noviembre, 2020

ABSTRACT

The use of molecular tools are proliferating in various branches of science such as evolution, community ecology, medicine, including also conservation biology and molecular ecology. One of the two most used techniques for the study of fauna conservation are qPCR and Metabarcoding.. How useful are they when it comes to detecting rare species that are found in very localized places? In this MSc thesis, developed in the context of the Life Tritó Montseny research project, the main aim to achieve is to elucidate the adequacy of the qPCR and Metabarcoding methods for detecting *Calotriton arnoldi* in community DNA extracted from the sediments. This is an endemic amphibian of the Catalan territory, located in the Montseny Natural Park, with a high patrimonial value. However, the species is often difficult to capture, which is critical for assessing the success of the actions carried out in matters of their conservation.

Methodologically, this project has designed specific primers for amplifying DNA from *C. arnoldi*, which should facilitate the detection of *C. arnoldi* through the amplification of environmental DNA sequences sampled in the sediment of streams in the area (non-invasive technique).. The results obtained have been compared with results that previously were obtained using metabarcoding tools. Despite the new methodology based on qPCR is not fully applicable, the results are promising for establishing in a short-term future the new protocols for a routine detection of *C. arnoldi* in the Montseny.

Resumen

El uso de las herramientas moleculares está proliferando en diversas ramas de la ciencia como evolución, la ecología de comunidades, la medicina, incluyendo también la biología de la conservación y la ecología molecular. Dos de las técnicas con más potencial y utilizadas para el estudio de la conservación de fauna son la qPCR y el Metabarcoding. Sin embargo, ¿Qué utilidad tienen a la hora de detectar especies raras que se encuentran en puntos muy localizados? En este trabajo, incluido dentro del proyecto Life Tritó Montseny, se pretende ver la utilidad que presentan tanto la qPCR como el Metabarcoding para la localización del *Calotriton arnoldi*. Esta es una especie de anfibio endémico localizado exclusivamente dentro del Parque Natural del Montseny con un importante valor patrimonial para el territorio. Pero a su vez presenta una gran dificultad a la hora de localizar sus poblaciones y evaluar su respuesta a las acciones llevadas a cabo para su conservación.

Para ello se ha trabajado en el diseño de un primer específico que permita la localización del *C. arnoldi* a través de la amplificación y cuantificación mediante qPCR de secuencias de DNA ambiental muestreadas en los sedimentos de arroyos de la zona (técnica no invasiva). Este primer se pretende usar para la detección específica de *C. arnoldi* a partir de DNA de los sedimentos de su hábitat usando qPCR. Estos resultados se han comparado con la especificidad obtenida con herramientas de metabarcoding y los datos de presencia de la especie observados con capturas en el Parque Natural del Montseny. Aún con las potencialidades de la qPCR, todavía se requiere de más experimentos para optimizar su aplicación rutinaria en la gestión del tritón del Montseny.

AGRADECIMIENTOS

En un lugar de la UB, cuyo nombre no hace falta acordarse, un estudiante después de leer muchos y muchos artículos inició un proyecto junto a sus dos estimados tutores con el fin de titularse ecólogo. Y al igual que Don Quijote buscó durante sus aventuras a una bella dama por cuyo honor luchar. Estos tres sujetos escogieron a un ser quizás un poco más pequeño y de cuerpo aplanado. Con gránulos protuberantes y uñas córneas en sus cuatro patas. Tras escoger a su anfibia dama, avanzaron en sus aventuras enfrentándose a molinos, rebaños de ovejas y toneles de vino, mientras su entorno los observaba sin entender muy bien que estaban haciendo. Sin embargo, al final, resultó que los toneles si eran gigantes, los rebaños ejércitos y los molinos un gran gigante llamado OBITools. Pudiendo así volver a casa, como pudieron, con una pareja de primers para su anfibia Dulcinea.

Y tal y como sucedió en la obra de Cervantes, estos tres sujetos pudieron recibir algo de ayuda por el camino de gentes que por allí pululaban. Y es por ello que es necesario dar las gracias a:

- Salvador Carranza, por proporcionarnos las muestras de DNA de los anfibios que nos han permitido testar el primer.
- Owen S. Wangensteen, por poder asesorarnos y resolver dudas técnicas de cara al diseño experimental del proyecto.
- Elisenda Ballesté, por asesorarnos en el diseño experimental y el proceso de la qPCR.
- Alba Enguídanos y Miquel A. Arnedo, por abrirnos las puertas del laboratorio y discutir los problemas técnicos.

A mis compañeros Cesc Rivero y Cinta Golorons con quien he compartido gran parte del proyecto durante las reuniones de las tutorías del mismo.

Y finalmente a Cesc Múrria y a Joan Gomà, mis dos tutores, por la oferta del proyecto, todo lo que he podido aprender y, por supuesto, la experiencia de haber trabajado con vosotros, de la cual me llevo un bonito recuerdo.

Sergio

Tabla de contenidos

1. Introducción	06
1.1. Técnicas moleculares aplicadas a la distribución de especies	07
1.1.1. Metabarcoding	07
1.1.2. qPCR	08
1.2. Tritón del Montseny	09
1.2.1. Distribución del <i>C. arnoldi</i>	09
1.2.2. Ecología del tritón	10
1.2.3. Amenazas para la conservación del <i>C. arnoldi</i>	10
1.2.4. Proyecto Life Tritó Montseny	11
1.3. Objetivos	12
1.3.1. Objetivos Generales	12
1.3.2. Objetivos Específicos	12
1.4. Hipótesis	12
2. Metodología y Materiales	13
2.1. Diseño de primers <i>in silico</i>	13
2.1.1. ¿Qué se necesita para diseñar los primers?	15
2.1.2. Diseñar primers específicos	15
2.1.3. Comprobación <i>in silico</i> del primer	16
2.2. Validación del primer en el laboratorio	17
2.3. Amplificación selectiva de <i>C. arnoldi</i>	18
2.4. Comparación de la eficiencia de detección	18
3. Resultados	20

3.1. Diseño y validación del primer	20
3.2. Amplificación selectiva de <i>C. arnoldi</i>	21
3.3. Metabarcoding como herramienta de detección de <i>C. arnoldi</i>	21
4. Discusión	22
5. Conclusiones	24
6. Referencias	25
7. Material suplementario	28
7.1. ANEXO I: Tablas	28
7.1.1. Tabla 1. Especies de anfibios y disponibilidad de genoma	28
7.1.2. Tabla 2. Disponibilidad de Genes 12S, 16S, CytB y NADH	31
7.1.3. Tabla 3. Combinaciones de primers	32
7.2. ANEXO II: Figuras	33
7.2.1. Figura 1. Resultados réplica PCR	33
7.2.2. Figura 2. Puntos de muestreo: Amplificación de secuencias	34
7.2.3. Figura 3. Puntos de muestreo: MDS Metabbarcode de sedimentos	35
7.2.4. Figura 4. Puntos de muestreo: Diversidad de Shannon	36
7.2.5. Figura 5. Puntos de muestreo: Amplificación de secuencias	37
7.2.6. Figura 6. Comunidades de macroinvertebrados acuáticos	39

1. Introducción

La biodiversidad tiene un papel fundamental para sostener la vida en el planeta porque es clave para mantener el funcionamiento de los ecosistemas (Tilman 1999, Loreau y Hector 2001). Aún esta importancia, debido a la expansión de la influencia humana, ya sea en términos de superficie o por el impacto del cambio climático, la biodiversidad y consecuentemente el funcionamiento de los ecosistemas se están deteriorando. La perdida de biodiversidad tiene graves consecuencias para nuestra sociedad (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, Perspectiva Mundial sobre la Diversidad Biológica 3. Montreal, 2010. 94 páginas), y es urgente tomar severas decisiones en políticas ambientales para revertir esta situación.

En la década de los 80 se consolidó la biología de la conservación para estudiar las causas de la pérdida de biodiversidad y crear herramientas que permitan revertirla (Simberloff, 1988). Su objetivo principal sigue siendo todavía conservar especies, hábitats y ecosistemas, y se nutre de una visión pluridisciplinaria que integra el trabajo de taxónomos, ecólogos, sociólogos o polítólogos. Tradicionalmente, en biología de la conservación (y especialmente los taxónomos) se ha ignorado los métodos y análisis basados en perspectivas filogenéticas y moleculares utilizadas para identificar procesos ecológicos, biogeográficos o evolutivos relacionados con el riesgo o posible extinción de especies (Fisher y Owen, 2004, Eguiarte et al., 2007). Sin embargo, las técnicas moleculares han proliferado en los últimos años y se han convertido en una herramienta indispensable para muchas ramas de la ciencia (incluida la evolución, la ecología, la medicina o la investigación en biodiversidad y conservación). Las nuevas metodologías moleculares permiten por ejemplo asignar el nombre de cada especie a los individuos que forman una comunidad (Creer et al., 2016). Para la ecología de comunidades y poblaciones, el conocimiento de la diversidad y composición genética de los taxones es de vital importancia para entender los patrones de diversidad y, a partir de ellos, estudiar las diferencias entre organismos, determinar la capacidad de respuesta a cambios ambientales y proponer estrategias para el manejo de los recursos naturales y su conservación.

1.1. Técnicas moleculares aplicadas a la identificación de especies

Los marcadores moleculares genéticos son una secuencia corta de DNA con una ubicación física específica y conocida, ya sea en el DNA nuclear, ribosómico o mitocondrial. Hay de varios tipos y se han convertido en herramientas valiosas para la detección de especies o para determinar la diversidad genética intra o interespecífica (MR Alcántara, 2007). También destaca su consecuente aplicación en programas de selección genética de plantas, animales y microorganismos. Los polimorfismos (o variantes) a nivel de DNA pueden ser detectados mediante diversas técnicas en laboratorio que permiten la extracción, corte o amplificación de estas unidades de DNA. Los marcadores de DNA vinculados a una morfología concreta se pueden utilizar para amplificar secuencias mediante PCR gracias al diseño de primers específicos (J. Williams et. Al., 1990).

A principios de milenio, se empezó a desarrollar la idea del *DNA taxonomy* que propone usar una región de un gen bien conservado a nivel de especies, pero con variabilidad entre ellas, para poder identificar especies a partir de una secuencia de DNA (Tautz et al., 2003). Esta región se propuso que se llamaría *DNA barcode* ya que podría actuar de código de barras genético y serviría para identificar cada una de las especies del planeta (Hebert et al., 2003). La región finalmente seleccionada fue un fragmento de 658 bp de la primera parte del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa C subunidad I (*cox1*) (Hebert et al., 2003). Una vez construida una librería de DNA barcodes para todas las especies (Múrria et al., 2020), a partir de una secuencia de *cox1* de una especie desconocida se podría asignar el nombre de la especie (Hajibabaei et al., 2007).

1.1.1. Metabarcoding

El metabarcoding es método que utiliza técnicas de DNA barcoding y herramientas de bioinformática para la identificación simultánea de especies en muestras que contienen muchas especies. Se puede realizar metabarcoding a partir de DNA de muestras de tejido objetivo, mezclas biológicas o muestras ambientales (agua, sedimentos) de donde se extrae el DNA de la muestra compuesto por múltiples especies. Este se puede amplificar mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y después se procede a su secuenciación usando High-Throughput Sequencing Technologies (HTS)

que permite la secuenciación en paralelo de miles secuencias. La detección de especies se realiza al amplificar DNA de una muestra para un gen específico o múltiples segmentos de genes que pueden variar en función del grupo de estudio para los cuales existe un repositorio con su información taxonómica (Múrria et al., 2020). Por ejemplo, el gen mitocondrial *cox1* es ampliamente usado para metazoa, el gen 12S para vertebrados y el gen 16S o 18S para bacterias. Este método destaca por su sensibilidad, cosa que permite la detección de organismos en el ambiente muestreado sin tener que recolectar o matar especímenes.

Las secuencias obtenidas con herramientas bioinformáticas se comparan con bibliotecas de referencia donde se almacenan los datos de las secuencias de DNA de las especies para poder asignar a cada secuencia una información taxonómica. Se podrá saber de esta forma a que taxón corresponde las distintas muestras de DNA amplificado. A medida que estas bibliotecas de referencia de DNA barcodes se van ampliando para mas especies, la información obtenida es mas precisa y por tanto se pueden obtener mejores resoluciones en la asignación.

La aplicación del metabarcoding en la ecología permite determinar en una sola reacción de amplificación y secuenciación todas las especies que componen una comunidad (Andújar et al., 2018). Además, esta metodología ha resultado útil para la identificación de nuevas especies, la identificación y evaluación de la interacción entre especies, la detección de especies exóticas, la identificación de especies en peligro de extinción o identificar especies en los estadios larvarios garantizando el estudio mediante una técnica no invasiva permitiendo un menor contacto y alteración de las especies de el medio (Miya et al.2015, Lim et. al., 2016).

1.1.2. qPCR

La qPCR es una técnica molecular utilizada para la amplificación y poder cuantificar el producto de DNA amplificado. Esta cuantificación se realiza gracias a la emisión de un haz de luz con una longitud de onda capaz de detectar una fluorescencia emitida por un fluoróforo o por una sonda molecular. Este proceso es similar al proceso de una PCR convencional. Por lo que se realizará una primera fase entorno a 95°C que permite la separación de la cadena de DNA. Seguida de una segunda fase, *annealing*, donde se realizarán entre 30 y 40 ciclos oscilando la temperatura entre los 95 y 50-60°C para enganchar los primers y finalmente realizar una fase de elongación con la Taq polimerasa donde se acaba de realizar el anillamiento (Thornton, Basu, 2011).

Las qPCR que emplean fluoróforos para la detección de las fluorescencias utilizan compuestos orgánicos $C_{32}H_{37}N_4S$ llamados SYBR Green (Sybr green I $C_{32}H_{37}N_4S^+$, PubChem), debido a que la longitud de onda que emiten es de entre 498 a 522 nm correspondiente al color verde del espectro de emisión de la radiación. Esta técnica solo requiere dos pares de primers por lo que el coste queda abaratado, sin embargo es menos específica en comparación a los métodos de sondas moleculares.

Las sondas moleculares, como las sondas TaqMan, son sondas de hidrólisis formadas por un fluoróforo unido mediante enlaces covalentes a oligonucleótidos y un quencher, para anular la fluorescencia del fluoróforo . A medida que la Taq polimerasa sintetiza la cadena el enlace entre el quencher y el fluoróforo se degrada, al requerir los oligonucleótidos para su formación. Al romperse el enlace estos se separarán anulando la inhibición y permitiendo la detección de la fluorescencia por cada amplificación dada en el proceso de la qPCR (Thornton, Basu - 2011). Este proceso permite una mayor eficiencia y especificidad a la hora de llevar a cabo el recuento de las amplificaciones dadas en el proceso que usando una PCR convencional, sin embargo la necesidad del diseño y compra de la sonda aumenta los costes del proceso.

1.2. Tritón del Montseny

El tritón del Montseny es una especie de anfibio urodelo endémica del macizo del Montseny. Clasificada como el único vertebrado propio del territorio catalán. Pese a que fue descubierta el año 1971 (Montori, A., y Pascual, X., 1981), no se distinguió del *Calotriton asper* como especie hasta 2005 (Carranza, S., y Amat, F., 2005). La inclusión de la nueva especie supuso el inicio de su conservación debido al área reducida de la distribución de sus poblaciones y el número estimado de ejemplares adultos, especialmente tras ser declarada como especie en peligro crítico y considerada el anfibio más amenazado de Europa.

1.2.1. Distribución del *C. arnoldi*

La especie no solamente es endémica del Montseny sino que se encuentra únicamente en torrentes de la cuenca de La Tordera. La extensión de conjunto de torrentes que habitan es menor a 4 km lineales suponiendo una cifra de unos 8 km² de extensión

situados entre 600 y 1.200 m de altitud en el macizo. Podemos encontrar 2 poblaciones genéticamente diferenciadas separadas en las dos vertientes de la cuenca –oriental y occidental- en 2 subgrupos de 3 poblaciones a un lado del río y 4 al otro. La Tordera supone un hábitat desfavorable que impide el contacto entre ambos grupos de poblaciones. (Carranza, S., y Amat, F., 2005).

El hábitat de la especie corresponde a torrentes abruptos de pendientes pronunciadas con rocas fisuradas que constituyen un lecho rocoso que permite la presencia de parte del caudal subterráneo. Se encuentra en tramos de aguas limpias, frías y muy oxigenadas para facilitar la respiración cutánea.

1.2.2. Ecología del tritón

El tritón se ha adaptado como especie especialista en torrentes. No superan los 12 cm de longitud, su cuerpo es aplanado para entrar mejor en las grietas donde encuentra refugio. En la piel tienen gránulos protuberantes para dificultar resbalar entre las rocas y en los dedos presenta uñas cónicas que permiten su sujeción en las grietas. Realizan la respiración cutánea a través de la piel del cuerpo y boca, es por ello que requiere de aguas muy oxigenadas y limpias como hábitat, para respirar adecuadamente.

La longevidad del *C. arnoldi* es de aproximadamente 9 años y su ciclo de vida consta de cuatro fases: huevo, larva, joven y adulto. Los tritones mantienen una actividad nocturna o a desplazarse por zonas muy sombrías de los torrentes en caso de realizar actividad diurna. La actividad de los individuos se desarrolla en los meses de primavera, donde se lleva a cabo la principal actividad reproductiva, y también en otoño pese a que la actividad reproductiva es más reducida. La edad reproductora es alrededor de los 4 años donde el individuo alcanza la madurez sexual y pasaría a ser considerado adulto, y las fases larvarias y juveniles son difíciles de encontrar. Por todo ello es una especie muy esquiva y su localización y censo riguroso difícil de registrar.

1.2.3. Amenazas para la conservación del *C. arnoldi*

El *C. arnoldi* fue clasificado como especie en peligro de crítico por la IUCN incluyendo la especie en la lista roja en 2009 Categoría global IUCN : En peligro crítico B2ab (Carranza, S., y Martínez-Solano, I., 2011). Se ha estimado que en total el número de

individuos adultos no supera los 1.600 ejemplares con el agravante de una disminución de un 15% de la especie desde 1995.

El cambio climático es un problema a largo plazo que ha derivado en un aumento de la temperatura de 1°C en el macizo del Montseny durante el último siglo. Un aumento de temperatura que supone un aumento de la evaporación y evapotranspiración que deriva en mayor aridez e irregularidad en las precipitaciones dando más sequías en los períodos de primavera, donde el tritón tiene una mayor actividad y es su principal periodo de reproducción (Carranza, S., y Amat, F., 2006; Ledesma et al 2019).

La sequía de los torrentes se debe tanto a la combinación de causas climáticas, provocadas por el cambio climático, como por la sobreexplotación de los acuíferos y la ascensión de los bosques a regiones más elevadas donde la recarga hídrica es menor, suponiendo una traba más para la conservación de la especie. Por otra parte, la sustitución del bosque de ribera por plantaciones no autóctonas de crecimiento rápido generan una acumulación de sedimentos que alteran las características de los torrentes.

1.2.4. Proyecto Life Tritó Montseny

“Life Tritó Montseny” (LIFE15 NAT/SE/000757) es un programa de conservación de *C. arnoldi* y de su hábitat. Iniciado el 1 de octubre de 2016 y previsto hasta 2020 pese a su actual revisión para extenderlo hasta 2022. Cuenta con alrededor de cincuenta acciones para la conservación tanto de la especie como del hábitat. Las acciones se llevan a cabo principalmente en el Parque Natural y Reserva de la Biosfera del Montseny, aunque también se llevan acciones en centros donde se colabora con el proyecto como los centros de cría en cautividad en los Centro de Recuperación de Fauna de Torreferrusa, Pont de Suert y también en el Zoológico de Barcelona. Además de la colaboración en los proyectos de la Universidad de Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona, y los agentes rurales.

El proyecto es coordinado por la Diputación de Barcelona mediante el área de Territorio y Sostenibilidad asociada con la Diputación de Girona y con el Departamento de Territorio y Sostenibilidad y la Dirección General de Políticas Ambientales de la Generalitat de Cataluña, Forestal Catalana y el Zoo de Barcelona.

El desarrollo de los programas y acciones llevadas a cabo se han enfocado a realizar actuaciones de gestión del hábitat y las poblaciones de la especie englobadas en

vigilancia del estado de la conservación, seguimiento de las poblaciones, estudio de las características genéticas, diagnosis de la salud de las poblaciones y educación ambiental.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivos generales

- Diseñar un protocolo molecular para detectar la presencia del tritón del Montseny utilizando un método molecular no invasivo.
- Detectar la presencia del tritón amplificando DNA ambiental de los sedimentos de los arroyos y torrentes del Montseny.

1.3.2. Objetivos específicos

- Compilar información de los mitogenomas de todos los anfibios que tengan disponibles en GenBank.
- Diseñar primers específicos para el tritón del Montseny.
- Optimizar el protocolo de la PCR para estos primers y desarrollar un protocolo para realizarlo en qPCR.
- Testar el protocolo en muestras de DNA de sedimentos de diferentes arroyos del Montseny, ya muestreadas y secuenciados antes de este TFM.

1.4. Hipótesis

Tanto el metabarcoding como la qPCR se presentan como herramientas útiles para la detección de especies y avances en la ecología de la conservación. Sin embargo, las características del metabarcoding, pese a su utilidad para establecer relaciones de comunidades, presentan primers degenerados menos selectivos y con la limitación por la necesidad de obtener de bibliotecas de secuencias aún por mejorar, sumado a la

ambigüedad de la amplificación de fragmentos de DNA no específicos que pueden hacer dudar de la presencia concreta de especies concretas buscadas en un punto de muestreo. Estos inconvenientes no los presentaría en cambio la qPCR ya que utiliza un primer específico para cada especie que reduciría el número de falsos positivos al detectar únicamente la presencia de la especie buscada en muestras compuestas por DNA de muchas otras especies.

Por tanto, a través de estas observaciones se ha establecido como hipótesis que la qPCR será una herramienta más efectiva y un mejor método para la detección del tritón del Montseny a la hora de realizar el seguimiento poblacional de la especie de cara a la comprobación de la efectividad de las acciones implementadas por el proyecto Life Tritó del Montseny.

2. Metodología y Materiales

Para desarrollar los objetivos planteados, se han distinguido cuatro fases:

1. **Diseño del primer *in silico*** que comprende desde la selección y acopio de datos moleculares de especies sobre las que testar el primer específico para *C. arnoldi*, hasta la prueba *in silico* con la que se puede comprobar, mediante simulaciones por ordenador, cual de los distintos primers obtenidos es válido.
2. **Validación del primer en el laboratorio** donde se diseñan los experimentos para seleccionar la mejor combinación de primers antes de las qPCR usando el DNA extraídos de los sedimentos.
3. **Amplificación selectiva de *C. arnoldi*** mediante una qPCR de los sedimentos de los distintos ríos del Montseny
4. **Validación de los resultados obtenidos** con el muestreo nocturno de *C. arnoldi* y los datos obtenidos con metabarcoding de los genes *cox1* y *12S*.

2.1. Diseño de primers *in silico*

Se han seleccionado un total de 33 especies de anfibios europeos, incluyendo 17 especies que se localizan en Cataluña. En esta selección se ha procurado que quedarán incluidas las 12 especies reconocidas en la guía de especies de Montseny para obtener un primer más fiable que permita la detección de *C. arnoldi*. Además, se

han incluido las especies filogenéticas y territoriales más próximas que facilitarían la detección de falsos positivos en las muestras de sedimentos.

Una vez identificadas, se ha recurrido a la base de datos de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para recopilar los genomas mitocondriales de estas especies. Para facilitar la posterior alineación, se han procurado descargar los genomas completos de las especies con las que se ha trabajado. Sin embargo, al no tener el genoma del *C. arnoldi* completo, para las especies que tampoco tuvieran el genoma secuenciado se han descargado los genes 12S, 16S, CytB y NADH, homólogos a los genes obtenidos del tritón del Montseny. Para aumentar la probabilidad que el primer diseñado detecta únicamente tritón del Montseny, en la base de datos también se incluye variación intraspecífica por esto se han descargado datos para varios individuos de la misma especie. El conjunto de especies seleccionadas y la disponibilidad de sus genomas quedan recogidos en las Tablas 1 y 2 incluidas en el Anexo I.

Una vez descargadas todas las secuencias, se ha usado Bioedit (Hall, T.A. 1999) para emparejar los genomas de las especies con el *C. asper*, especie mas cercana al *C. arnoldi*, para después realizar los alineamientos con la herramienta de alineación de MAFFT (Katoh, Rozewicki, Yamada - 2018). Posteriormente con BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0 (Hall, 1999) se han agrupado los genomas alineados y se han editado para alinearlos entre ellos mediante la opción “View conservation by plotting identities to a standard as a dot” utilizando el genoma del *C. asper* como referencia.

Los pasos seguidos a la hora de elaborar el diseño del primer se ha basado en el modelo de Eric Coissac para el desarrollo de metabarcode para peces (<http://metabarcoding.org/IMG/html/primerdesign.html>). Para elaborar los primers se han preparado previamente los datos según las necesitados del programa ecoPrimer de OBITools (Boyer et al. 2015) que no reconoce directamente los archivos de texto ni las bases de datos taxonómicas. Por esta razón, la nomenclatura del archivo de Genbank se ha modificado para la detección de la secuencia en OBITools usando como referencia el modelo “Nombre_Especie_IDdeGenBank taxid=NúmeroTaxid;”.

Ejemplo:

Calotriton_arnoldi_DQ092299 taxid=342570;

El taxid es una identificación numérica asociada a una base de datos taxonómica y permite enlazar la base de datos local y su relación entre los taxones usados. La

descarga de taxids se ha realizado de la base taxonómica del NCBI y posteriormente se ha formado la taxonomía con la herramienta de OBITools “obitaxonomy”.

2.1.1. ¿Qué se necesita para diseñar los primers?

Para diseñar primers específicos de DNA para el tritón del Montseny, se ha descargado del NCBI los siguientes datos:

- El conjunto completo de genomas mitocondriales de las especies seleccionadas en NCBI.
- El conjunto de datos de la taxonomía del NCBI.

También se necesita:

- Una ordenador con sistema operativo Linux con una terminal unix para escribir comandos.
- Instalar en el ordenador los siguientes programas:
 - OBITools - <http://metabarcoding.org/obitools>.
 - ecoPCR - <http://metabarcoding.org/ecopcr>.
 - ecoPrimers - <http://metabarcoding.org/ecoprimers>.
 - Bioedit - <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
 - R - <http://www.r-project.org>.

(Recomendable utilizar R con RStudio - <http://rstudio.com/>)

- Otros programas o aplicaciones utilizados:
 - MAFFT - <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>.

2.1.2. Diseñar primers específicos

Una vez preparadas las bases de datos, estas se han enlazado con las bases de datos taxonómicas mediante la herramienta “obiconvert” elaborando una base de datos en formato ecopcr.

El diseño de los primers se ha realizado mediante ecoPrimer de OBITools. El criterio para elaborar los primers ha sido optimizar (1) primers de una longitud de 24 bp tanto para el primer *forward* como para el *reverse*, (2) amplificar regiones de entre 70 a 200 bp y (3) temperatura óptima de annealing en las PCR de 60º. Para elaborar los primers

se ha especificado que la cadena era circular y el taxid de la especie de referencia de la cual se busca la especificidad, el *C. arnoldi*. Además el resto de taxids de las especies de anfibios seleccionadas se han especificado en ecoPCR como contraejemplos para poder eliminar las combinaciones de primers candidatas que amplifiquen regiones comunes en varias especies. Finalmente, para aumentar la especificidad de los primers, se ha seleccionado un quórum de coincidencia estricto del 95% junto a un margen de error de 0 en los desajustes permitidos por el primer y 2 nucleótidos que coincidan estrictamente con la secuencias objetivo del extremo 3' de los primers.

De los primers diseñados, se ha realizado un proceso de criba para su testación en las pruebas *in silico*. Para ello se han seleccionado aquellos primers que amplifican una secuencia correspondiente a un taxon de la base de datos elaborada anteriormente con el contenido filogenéticamente cercano al *C. arnoldi*. Posteriormente, se han filtrado aquellos primers cuya proporción de éxito sea del 100% y que presenten en el indicador GoB un resultado de GG, good-good, bueno para ambos primers de la pareja.

También se han seleccionado aquellos cuyas temperaturas óptimas de annealing oscilen entre los 55 y los 65°C, procurando que ambas parejas tengan la mayor similitud de temperatura posible y eliminando aquellas parejas que contengan una temperatura mínima del primer con valores anómalos. Entre los que se incluyen temperaturas superiores a las temperaturas óptimas o temperaturas muy inferiores a las temperaturas optimas, siendo delimitadas en aquellas inferiores a 48°C para evitar la activación de los primers a temperatura ambiente.

Finalmente, los primers seleccionados se han ajustado para optimizar su temperatura acercándola lo máximo posible a los 60°C. Esta optimización se ha realizado mediante la adición, eliminación o desplazamiento de nucleótidos de las bases correspondientes al primer sobre la secuencia de *C. arnoldi* intentado aumentar la proporción de G ó C. En paralelo, y para aumentar la especificidad de los primers, se han eliminado cuando era posible las A y T correspondientes a los espacios de las inserciones.

2.1.3. Comprobación *in silico* del primer

Para finalizar el proceso de diseño, los primers seleccionados y, en caso de ser necesario, modificados se han testado mediante simulaciones a través de ecoPCR de

OBITools. Las simulaciones se han realizado con amplificaciones de regiones de 70 a 200 bp con un margen de 0 errores en el proceso de amplificación.

Las parejas de primers positivas testadas *in silico* con la base de datos de especies cercanas genéticamente y territorialmente al tritón, han sido comprobadas también con varios individuos de la misma especie para recoger su variabilidad intraespecífica y así comprobar la efectividad de detección del primer para con la especie buscada.

2.2. Validación del primer en el laboratorio

Una vez se ha seleccionados los primers para los genes de 12S y 16S que van a utilizarse se ha elaborado una lista de las posibles combinaciones de los distintos primers *forwards* y *reverse*. El conjunto de combinaciones se han testado usando las siguientes condiciones de PCR: (1) desnaturación inicial a 95°C durante 10 min, (2) 40 ciclos de desnaturación a 95°C durante 15 segundos seguidos de un periodo de hibridación a 60° durante 1 min, (3) conservación a 4°C hasta la retirada del producto. El volumen final de PCR era de 20 µL y contenía 11,8 µL de agua, 5 µL de *Red Buffer*, 0.2 µL de Taq Polimerasa, 1 µL de primer *forward*, 1 µL de primer *reverse* y 1 µL de DNA de la muestra.

En las primeras PCR se han usado controles positivos (DNA de *C. arnoldi*) i controles negativos (agua) para cada combinación de primers. Los primers cuyo PCR ha dado negativo, no han amplificado *C. arnoldi*, se han desestimado mientras que los positivos, han amplificado *C. arnoldi*, pasarán a la segunda fase en el laboratorio.

En la segunda fase, se ha testado la especificidad de los primers seleccionados con DNA de las especies genéticamente cercanas como *C. asper*, *Triturus marmoratus* y *Salamandra salamandra* junto a un control positivo con DNA del *C. arnoldi* y un control negativo para comprobar la veracidad de los resultados.

La combinación de primers que ha dado resultado positivos para *C. arnoldi*, pero negativos para el resto de especies y para el control negativo, han pasado un tercer filtro en el que se ha realizado mas PCRs para comprobar la replicabilidad del resultado y confirmar su eficacia para poder ser testarlos mediante qPCR.

2.3. Amplificación selectiva de *C. arnoldi*

Para realizar la qPCR se ha requerido *dilution buffer*, DNA del tritón y DNA extraído de los sedimentos. El *dilution buffer* se ha obtenido mezclando 9,970 µL de *water molecular biology grade*, 10 µL de TrisHCl con pH 8.0 - 1M, 10 µL de EDTA 0,5 M y 10 µL Tween 20. El DNA del *C. arnoldi* se ha cuantificado estableciendo la media de cuatro muestras del modelo de DNA mediante Qubit (Broad Range) estableciendo una regresión comparada con dos muestras estándar del kit comercial (ThermoFisher Scientific). Para preparar los tres estándares de *C. arnoldi*, el DNA se ha diluido con *dilution buffer* a 1:10k, 1:50k y 1:100K. Sabiendo la concentración original de DNA de la muestra, la recta patrón generada con los estándares de *C. arnoldi* servirá para estimar la concentración de DNA en los sedimentos. En paralelo, las muestras de DNA de los sedimentos de campo se han diluido a 1:10, 1:100 y 1:1k. Añadiendo 3 µL de DNA de la muestra o dilución previa y 27 µL de *dilution buffer*.

Se han realizado 3 réplicas de qPCR para cada dilución incluyendo estándares, muestras y un control negativo de las muestras sin DNA (añadiendo únicamente *buffer*). El protocolo para llevar a cabo la qPCR se ha mantenido del realizado anteriormente con las PCR durante la validación del primer. Con una fase de desnaturalización de 95°C durante los primeros 10 minutos, seguida de 40 ciclos con una primera desnaturalización de 15 segundos a 95°C bajando a 60°C para la realización del anillamiento. Las muestras preparadas para la qPCR se han preparado con 10 µL de mix, 1 µL de primer *forward* 10 µM, 1 µL de primer *reverse* 10 µM, 2 µL de DNA y 6 µL de H₂O.

Se han seleccionado 4 muestras de campo, para el testeo de la eficiencia de la qPCR, donde se sabe de la presencia del tritón y el metabarcoding ha amplificado (sBA_04) y donde el metabarcoding no lo ha amplificado (sBA_06), y sin presencia de tritón pero amplificada por el metabarcoding (sTO_13) y sin ser amplificada por el metabarcoding (sCF_09).

2.4. Comparación de la eficiencia de detección

Se ha seleccionado los resultados del metabarcoding para *cox1* de los sedimentos del Montseny elaborada por Cesc Múrria, Owen Wangsteen y Joan Gomà en 2019 para comparar los resultados obtenidos usando metabarcoding. Las extracciones de los

puntos seleccionados para el metabarcoding se han usado para realizar las qPCR, para la correcta comparación de las distintas metodologías.

La asignación de especies final obtenida usando el metabarcoding se han mejorado (incrementando el *best identity score*) usando las herramientas de blast en GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) y Boldsystems (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine) y escogiendo la asignación correspondiente al mayor valor de *best identity score*. Una vez mejoradas las asignaciones, se ha preparado un subset seleccionando las secuencias correspondientes a las especies de macroinvertebrados acuáticos incluidas en el listado de familias que se usan en el protocolo para el cálculo del índice IBMWP (Alba-Tercedor et al., 2002). Estas especies se han cribado mediante la base de datos de WORMS (<http://www.marinespecies.org/>) y EU-nomen (<http://www.eu-nomen.eu/portal/>) para retirar especies marinas y eliminar de falsos positivos en el territorio. De las secuencias restantes se ha eliminado aquellas con que presentaban una *best identity score* inferior al 85% y número de *reads* menor a 5.

El análisis estadístico se ha realizado mediante R elaborando barplots para la comparación de las abundancias de la amplificación de secuencias con los puntos conocidos de la presencia del tritón de cara a valorar si la amplificación por metabarcoding y verificar la efectividad de herramienta para su detección. Así como la abundancia relativa de especies y la diversidad para comprobar la relación entre la presencia del *C. arnoldi* con las comunidades detectadas de su entorno. Finalmente se ha elaborado dos MDS mediante Ginkgo (De Cáceres et al. 2003). El primero, para observar y poder establecer agrupaciones de los puntos de muestreo donde la metabarcoding haya permitido la amplificación de las secuencias. Y el segundo para estudiar las comunidades de macroinvertebrados acuáticos que se encuentran en los torrentes del Montseny para poder obtener una relación de las comunidades encontradas con la presencia del *C. arnoldi*.

3. Resultados

3.1. Diseño y validación del primer

De las 17 especies seleccionadas de Cataluña, se ha obtenido las secuencias de los 4 genes estudiados (12S, 16S, Cyt B y NADH) para 16 especies, (Tabla 2 del Anexo I). El genoma completo de 5 de ellos, *Alytes obstetricans*, *Pleobates cultripes*, *Rana temporaria* y *Triturus marmoratus*, así como *Salamandra salamandra*, excluyendo la subespecie *Salamandra salamandra salamandra*, se ha extraído de la base de datos de GenBank. Los genomas parciales se han conseguido para 13 especies mediante los genes 12S, 16S y Cyt B y 9 para el NADH. La disponibilidad de los genes se muestra en la Tabla 2.

De los 4 genes disponibles para el diseño de cebadores, solo los genes 12S y 16S se han modelado en pares de primers *in silico* ya que a simple vista son los que parecen mas específicos comparando la variabilidad de todos los genes para el conjunto de secuencias de la base de datos. De los 5853 bp para el gen 12S y 7225 bp para el gen 16S, se han seleccionado 8 primers incluyendo para las pruebas *in silico* para el gen 12S y 10 para los 16S porque cumplían las condiciones óptimas para el funcionamiento del primer. Quedando tras la simulación un total de 4 primers *forward* y 4 primers *reverse* para el gen 12S y 5 primer *forward* y 1 primer *reverse* para el gen 16S.

Para la validación del primer se han realizado las múltiples combinaciones posibles entre los primers testados *in silico* con resultados positivos, contando con 19 combinaciones, 14 para el gen 12S y 5 para el 16S, recogidas en la Tabla 3 del Anexo I. Las parejas de primers 3,5,6,7,8,12,13,14 de la Tabla 3 dieron positivo para la especie y negativo para el control. De estas, solo las parejas de primers 6 y la 13 dieron negativo para las especies cercanas y el control negativo y de nuevo, positivo para el *C. arnoldi*. Sin embargo, se descartó la pareja 13 al dar positivo para *Salamandra salamandra* en la replica realizada tras la segunda prueba correspondiente a la imagen de la Figura 1. Dando por valida la pareja de primers correspondiente al primer forward PF_12S_SG_58 CCCTCTAAGGGCCCAACAG y al primer *reverse* PR_12S_SG_59 CCTCCTTCGTAGTTTATTCACAAGCT.

3.2. Amplificación selectiva de *C. arnoldi*

Los resultados de la qPCR muestran ciclos umbrales, Ct, girando en torno a 26 o 27 de media con desviaciones estándar de 0,2 a 0,4. El umbral y la línea base se han establecido entre los 15-18 y 3 respectivamente. Las muestras seleccionadas no han dado señales de amplificación, al igual que el control negativo. Como el estándar de DNA que únicamente contenía muestras del tritón tampoco a llegado a amplificar las secuencias. Por lo tanto, las concentraciones de primers y los modelos de DNA todavía deben de optimizarse para facilitar la qPCR.

3.3. Metabarcoding como herramienta de detección de *C. arnoldi*

Como se observa en la Figura 2 de los 10 puntos donde se conoce la presencia de *C. arnoldi* del conjunto de muestras con las que contamos, se ha detectado DNA del tritón en 4 de ellos, sBA_04, sBA_06, sBA_07 y sST_01. Sin embargo, en 6 de los puntos, pese a conocerse su presencia no se ha detectado secuencias de DNA de la especie. Si observamos los puntos muestreados en el MDS de las comunidades de macroinvertebrados acuáticos de la Figura 3, podemos ver como no se evidencia una agrupación clara que permita la distinciones entre los puntos donde se presenta la detección de la especie. Ni tampoco se encuentra relación con la detección de tritón con una mayor, o menor, diversidad o composición de la comunidad, representada en la Figura 4, de los puntos de muestreo. Los taxones mas abundantes corresponden a la familia de las *Chironomidae* suponiendo entre el 40 y el 60% de las secuencias amplificadas por el *cox1*. Estos se encuentran en todos los puntos de muestreo, seguidas de las *Naididae* que pese a no encontrarse en todos los puntos se pueden localizar en la mayoría de ellos pudiendo llegar a suponer entre el 1 y 2% de las secuencias amplificadas. La riqueza de especies por punto de muestreo oscila entre 3 y 78. Las comunidades establecidas por los macroinvertebrados acuáticos, Figura 6, tampoco presentan agrupaciones que muestren grandes distinciones en las comunidades encontradas en el Montseny. Podemos observar como la distribución de las especie tienden a tener una composición muy similar en cuanto a ordenes de familias encontradas, distinguiéndose sólo por especies puntuales que se encuentran en proporciones de amplificaciones muy bajas que no llegan a suponer el 1% de las

amplificaciones encontradas. Las familias mas comunes, se presentan entre las menos amplificadas son las *Leutricidae*, las *Tipulidae* y las *Nemouridae* o *Nereididae*. Finalmente menor medida se pueden enconrear *Ephemeridae* o alguna *Cilicidaeo*, *Athericidae* pese a acostumbrar a ser mas residuales.

4. Discusión

Se ha podido comprobar como el metabarcoding de los sedimentos de los torrentes del Montseny no ha resultado ser una herramienta efectiva a la hora de detectar *C. arnoldi* comparándola con las muestras de presencia-ausencia del parque obtenida durante los muestreos nocturnos. El elevado número de falsos negativos para la secuencia escogida en a amplificación impide establecer esta técnica como una herramienta útil para el seguimiento poblacional de esta especie. En este caso, los primers degenerados diseñados para amplificar Metazoa (Wagensteen et al., 2018) son mas sensibles a la otras especies que a *C. arnoldi*, para el cual se han obtenido pocas secuencias. En concreto, pese a la ventaja que podría ofrecer la secuenciación masiva al detectar no sólo individuos de la misma especie sino de poder obtener una visión general de las comunidades que se establecen en su entorno (Cristescu, Melania E., 2014), esta no detecta a la especie de interés. Pese a que no sea una herramienta útil para la detección del *C. arnoldi*, esto no quiere decir que se deba descartar completamente como herramienta ya que tiene mucho potencial para el estudio de las comunidades en las que el *C. arnoldi* se encuentra. Esta posibilidad es especialmente atractiva a medida que las bibliotecas de DNA barcodes sean más precisas y las especies que habitan en el Montseny sean más estudiadas y sus genes secuenciados. Así, por ejemplo, se pueden hacer trabajos de dieta del tritón o comparar comunidades donde hay o no hay tritón para habilitarlas para él y diseñar futuras reintroducciones.

La qPCR, sin embargo, de momento tampoco ha dado resultados positivos para la detección del tritón al no amplificar las muestras seleccionadas. Pese a que las pruebas realizadas ha fallado el control positivo al no ser amplificado, todo indica que el problema es en las condiciones de las qPCR. Aunque los resultados no sean tan satisfactorios como los esperados, esto no indica que la amplificación de DNA de la especie a través de los sedimentos no sea posible (eDNA). Es interesante cuestionarse cuales pueden ser los fallos, basándonos en la tabla de resultados de la qPCR, que pueden llegar a la obtención de un error en el resultado de la prueba y como solventarlo. A priori, se puede descartar fallos en la configuración de la línea base y el umbral dado

que su reajuste solucionaría el error y evidentemente, un control positivo con resultado negativo es difícil solucionar con el reajuste de una constante que depende del resultado de tus muestras.

Los valores de la línea base altos o bajos pueden corregirse aumentando o reduciendo los valores del ciclo umbral durante el proceso. El umbral, por contra no supone un problema puesto que las desviaciones estándar no asumen valores superiores a la media encontrándose entre el 0,2 y 0,4. Los valores presentados por la qPCR no muestran valores atípicos que desvén significativamente de los errores experimentales (contaminación, error de pipeteo...), además las desviaciones de las amplificaciones pueden generar alteraciones en los umbrales y línea base que en principio no se muestran en nuestros resultados. Lo cual, podría indicar, aunque no se pueda afirmar con rotundidad, que se deba a errores experimentales. En las próximas semanas se va ha trabajar en optimizar el protocolo de qPCR para los estándares de *C. arnoldi* y posteriormente se van a testar de nuevo las muestras seleccionadas. En un futuro próximo, esperamos poder utilizar las técnicas de qPCR para detectar la presencia de *C. arnoldi* en los arroyos el Montseny utilizando el DNA capturado por los sedimentos (eDNA).

El mal funcionamiento del primer debido a un error en la fase de diseño o al testarlo puede ser también un motivo por el que no se hayan amplificado las muestras en la qPCR. Sin embargo, el proceso de selección se ha realizado probando los primers tanto *in silico*, como en laboratorio pasando tanto validaciones del primer para *C. arnoldi* con controles negativos como comprobaciones de especificidad con especies cercanas al tritón, controles positivos y negativos. Añadiendo la elaboración de réplicas. Por lo que podemos presuponer el correcto funcionamiento del primer, especialmente con la incertidumbre del conjunto de posibles fallos mencionados, a lo largo de la discusión.

Los resultados del metabarcoding indican que las comunidades donde habita *C. arnoldi* presentan poblaciones de macroinvertebrados acuáticos similares con una clara predominancia de *Chironomidae* y en la mayoría de puntos, presencia de *Naididae*. El resto de especies de macroinvertebrados acuáticos que habitan los torrentes se han detectado en concentraciones muy bajas pero siguen sin representar un gran cambio en las comunidades encontradas entre los diferentes puntos de muestreo.

5. Conclusiones

1. El metabarcoding no es una herramienta eficiente para la detección de *Calotriton arnoldi* en el Parque Natural del Montseny.
2. La pareja de primers PF_12S_SG_58 (CCCTCTAAGGGCCCAACAG) y PF_12S_SG_59 (CCTCCTTCGTAGTTTATTCACAAGCT) son una pareja primers diseñados y validados que permiten la amplificación de muestras de *Calotriton arnoldi* en laboratorio mediante PCR.
3. Los resultados negativos en la prueba de la qPCR indican que se requiere optimizar las condiciones de las qPCR calibrando los estándares, antes de descartarla como herramienta molecular viable para la detección del tritón.

6. Referencias

- Alba-Tercedor, J., Jáimez-Cuéllar, P. Álvarez, M. Avilés, J., Bonada, N. Casas, J., Mellado, A., Ortega, M., Pardo, I., Prat, N., Rieradevall, M., Robles, S., Sáinz-Cantero, C.E., Sánchez-Ortega, A., Suárez, M.L., Toro, M., Vidal-Abarca, M.R., Vivas, S., Zamora-Múñoz, C. (2004). Caracterización del estado ecológico de ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP antes BMWP¹. *Limnética*, 21(2002): 21, 3-4: 175-185
- Andújar, C., Arribas, P., Yu, D. W., Vogler, A. P., & Emerson, B. C. (2018). Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the metazoa. *Molecular Ecology*, 27(20), 3968–3975. <https://doi.org/10.1111/mec.14844>
- Alba-Tercedor, J., Jáimez-Cuéllar, P. Álvarez, M. Avilés, J., Bonada, N. Casas, J., Mellado, A., Ortega, M., Pardo, I., Prat, N., Rieradevall, M., Robles, S., Sáinz-Cantero, C.E., Sánchez-Ortega, A., Suárez, M.L., Toro, M., Vidal-Abarca, M.R., Vivas, S., Zamora-Múñoz, C. (2004). Caracterización del estado ecológico de ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP antes BMWP¹. *Limnética*, 21(2002): 21, 3-4: 175-185
- Barcelona, U. De. (2014). *Tritón del Montseny – Calotriton arnoldi Carranza y Amat , 2005 Félix Amat Àrea d ' Herpetologia , Museu de Granollers , Ciències Naturals 08840 Granollers Salvador Carranza Departament de Biologia Animal*. 1–6.
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 176–182. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
- Carranza, S., & Amat, F. (2006). Aproximació a l'evolució i biologia del tritó del Montseny. *Monografies Del Montseny*, 165–193.
- Burton, R. S. (2009). Molecular markers, natural history, and conservation of marine animals. *BioScience*, 59(10), 831–840. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.10.5>
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W. K., Potter, C., & Bik, H. M. (2016). The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. In R. Freckleton (Ed.), *Methods in Ecology and Evolution* (Vol. 7, Issue 9, pp. 1008–1018). British Ecological Society. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>
- Cristescu, M. E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: Towards an integrative approach to the study of global biodiversity. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 29, Issue 10, pp. 566–571). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- De Cáceres, M., Oliva, F., & Font, X. (n.d.). *GINKGO, UN PROGRAMA DE ANÁLISIS MULTIVARIANTE ORIENTADO A LA CLASIFICACIÓN BASADA EN DISTANCIAS*.
- Fisher, D. O., & Owens, I. P. F. (2004). The comparative method in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(7), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.05.004>
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Home · Wiki · OBITools / OBITools · GitLab. (n.d.). Retrieved November 15, 2020, from <https://git.metabarcoding.org/obitools/obitools/wikis/home>

Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2018). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Kennedy, S. R., Prost, S., Overcast, I., Rominger, A. J., Gillespie, R. G., & Krehenwinkel, H. (2020). High-throughput sequencing for community analysis: the promise of DNA barcoding to uncover diversity, relatedness, abundances and interactions in spider communities. *Development Genes and Evolution*, 230(2), 185–201. <https://doi.org/10.1007/s00427-020-00652-x>

Ledesma, J. L. J., Montori, A., Altava-Ortiz, V., Barrera-Escoda, A., Cunillera, J., & Àvila, A. (2019). Future hydrological constraints of the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) under changing climate and vegetation cover. *Ecology and Evolution*, 9(17), 9736–9747. <https://doi.org/10.1002/ece3.5506>

Lim, N. K. M., Tay, Y. C., Srivathsan, A., Tan, J. W. T., Kwik, J. T. B., Baloğlu, B., Meier, R., & Yeo, D. C. J. (2016). Next-generation freshwater bioassessment: eDNA metabarcoding with a conserved metazoan primer reveals species-rich and reservoir-specific communities. *Royal Society Open Science*, 3(11). <https://doi.org/10.1098/rsos.160635>

Loreau, M., & Hector, A. (2001). Partitioning selection and. *Nature*, 412(July), 72–76.

Luis E. Eguiarte, Valeria Souza y Xitlali Aguirre, Amanda Castillo Cobián, Erika Aguirre Planter, Alejandro Moreno Letelier, León, Mertinez Castilla, J. G. y J. ortega y C. A. A. G. y A. L. V. (2007). *Ecología molecular*. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=KT7YILvV6YMC&oi=fnd&pg=PP8&dq=Eguae+et+al.+2007&ots=4yHkEwk-Hy&sig=levaBQYyGRVX1GX6DWBbFv3xLTE#v=onepage&q&f=false>

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>

Múrria, C., Väisänen, L. O. S., Somma, S., Wangensteen, O. S., Arnedo, M. A., & Prat, N. (2020). Towards an iberian dna barcode reference library of freshwater macroinvertebrates and fishes. *Limnetica*, 39(1), 73–92. <https://doi.org/10.23818/limn.39.06>

Rentaría Alcántara, M. (n.d.). *Breve revisión de los marcadores moleculares*.

Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. In *Global Ecology and Conservation* (Vol. 17, p. e00547). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

Simberloff, D. (1988). The Contribution of Population and Community Biology to Conservation Science. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1), 473–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.002353>

Sybr green I | C32H37N4S+ - PubChem. (n.d.). Retrieved November 15, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sybr-green-I>

Taberlet, P., Coissac, E., & Pompanon, F. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding - TABERLET - 2012 - Molecular Ecology - Wiley Online Library. *Molecular Ecology*, ..., 33, 2045–2050. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x/full%5Cnpapers2://publication/uuid/30F6E470-48F9-4C24-A3C1-6964EE26B34F>

Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., & Vogler, A. P. (2003). A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(2), 70–74. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00041-1)

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145–154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>

Tilman, D. (1999). The ecological consequences of changes in biodiversity: A search for general principles. *Ecology*, 80(5), 1455–1474. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[1455:tecoci\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[1455:tecoci]2.0.co;2)

Wangensteen, O. S., Palacín, C., Guardiola, M., & Turon, X. (2018). DNA metabarcoding of littoral hardbottom communities: High diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*, 2018(5), e4705. <https://doi.org/10.7717/peerj.4705>

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

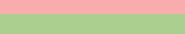
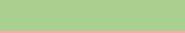
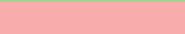
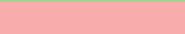
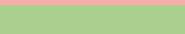
7. Material Suplementario

7.1. ANEXO I: Tablas

7.1.1. Tabla 1. Especies de anfibios y disponibilidad de genoma

TABLA 1 Tabla de recopilatoria del conjunto de especie de anfibios europeas disponibles en GenBank, (verde) Disponible, (rojo) No disponible. Distinguidas por localización, () Europea, (E), España, (C) Cataluña.

Especies		Localización	Genoma
Sapos - Nombre científico - Nombre común			
<i>Alytes cisternasii</i>	Sapo partero ibérico	E	
<i>Alytes dickhilleni</i>	Sapo partero bético	E	
<i>Alytes muletensis</i>	Sapo partero mallorquín	E	
<i>Alytes obstetricans</i>	Sapo partero común	E/C	
<i>Bombina bombina</i>	Sapillo de vientre de fuego		
<i>Bombina variegata</i>	Sapillo de vientre amarillo		
<i>Bufo bufo</i>	Sapo común europeo		
<i>Bufo spinosus</i>	Sapo común occidental	E/C	
<i>Bufoates boulengeri</i>	Sapo verde africano		
<i>Bufoates balearicus</i>	Sapo balear	E	
<i>Bufoates viridis</i>	Sapo verde		
<i>Discoglossus galganoi</i>	Sapillo pintojo ibérico	E	
<i>Discoglossus montalentii</i>	Sapillo pintojo de Cócega		
<i>Discoglossus pictus</i>	Sapillo pintojo común	E(I)/C	
<i>Discoglossus sardus</i>	Sapillo pintojo Sardo		
<i>Epidalea calamita</i>	Sapo corredor	E/C	
<i>Pelobates cultripes</i>	Sapo de espuelas occidental	E/C	
<i>Pelobates fuscus</i>	Sapo de espuelas pardo		
<i>Pelobates syriacus</i>	Sapo de espuelas oriental		
<i>Pelobates f. vespertinus</i>	Sapo pardo de Palla		
<i>Pelodytes caucasicus</i>	Sapillo moteado del Cáucaso		

<i>Pelodytes ibericus</i>	Sapillo moteado ibérico	E	
<i>Pelodytes punctatus</i>	Sapillo moteado común	E/C	
<i>Pelodytes atlanticus</i>	Sapillo moteado occidental	E	
<i>Pelodytes hespericus</i>	Sapillo moteado mediterráneo	E	
Ranas - Nombre científico - Nombre común			
<i>Hyla arborea</i>	Ranita arbórea Europea		
<i>Hyla intermedia</i>	Ranita arbórea Italiana		
<i>Hyla meridionalis</i>	Ranita meridional	E/C	
<i>Hyla molleri</i>	Ranita de San Antonio ibérica	E	
<i>Hyla orientalis</i>	Ranita arbórea oriental		
<i>Hyla sarda</i>	Ranita arbórea Sarda		
<i>Pelophylax bedriagae</i>	Rana verde Levantina		
<i>Pelophylax cretensis</i>	Rana verde de Creta		
<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	Rana esculenta		
<i>Pelophylax epeirooticus</i>	Rana de Epiro		
<i>Pelophylax lessonae</i>	Rana de piscina común		
<i>Pelophylax kl. grafi</i>	Rana híbrida de Graf	E/C	
<i>Pelophylax perezi</i>	Rana común ibérica	E/C	
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Rana europea común		
<i>Pelophylax shqipericus</i>	Rana común albanesa		
<i>Rana arvalis</i>	Rana campestre		
<i>Rana dalmatina</i>	Rana ágil	E	
<i>Rana graeca</i>	Rana griega		
<i>Rana iberica</i>	Rana patilarga	E	
<i>Rana italica</i>	Rana común italiana		
<i>Rana latastei</i>	Rana de lataste		
<i>Rana pyrenaica</i>	Rana pirenaica	E	
<i>Rana temporaria</i>	Rana bermeja	E/C	
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Rana toro americana		
<i>Xenopus laevis</i>	Rana de uñas africana		
Tritones - Nombre científico - Nombre común			
<i>Ommatotriton ophryticus</i>	Tritón crestado turco		
<i>Calotriton asper</i>	Tritón pirenaico	E/C	
<i>Calotriton arnoldi</i>	Tritón del Montseny	E/C	
<i>Euproctus montanus</i>	Tritón de Córcega		
<i>Euproctus platycephalus</i>	Tritón Corso		
<i>Lissotriton boscai</i>	Tritón ibérico	E	
<i>Lissotriton helveticus</i>	Tritón palmeado	E/C	

<i>Lissotriton italicus</i>	Tritón italiano		
<i>Lissotriton montandoni</i>	Tritón de Montadon		
<i>Lissotriton vulgaris</i>	Tritón punteado		
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	Tritón alpino	E	
<i>Triturus carnifex</i>	Tritón crestado italiano		
<i>Triturus cristatus</i>	Tritón crestado europeo		
<i>Triturus dobrogicus</i>	Tritón crestado del danubio		
<i>Triturus ivanbureschi</i>	Tritón crestado de Buresh		
<i>Triturus karelinii</i>	Tritón crestado de crimea		
<i>Triturus macedonicus</i>	Tritón crestado macedonio		
<i>Triturus marmoratus</i>	Tritón jaspeado	E/C	
<i>Triturus pygmaeus</i>	Tritón pigmeo	E	
Salamandras - Nombre científico - Nombre común			
<i>Pleurodeles waltl</i>	Gallipato	E/C	
<i>Chioglossa lusitanica</i>	Salamandra rabilarga	E	
<i>Lyciasalamandra luschnani</i>	Salamandra turca		
<i>Lyciasalamandra helverseni</i>	Salamandra de los cárpatos		
<i>Salamandra atra</i>	Salamandra alpina		
<i>Salamandra corsica</i>	Salamandra de Córcega		
<i>Salamandra lanzai</i>	Salamandra de lanzai		
<i>Salamandra salamandra</i>	Salamandra de fuego	E/C	
<i>Salamandrella keyserlingii</i>	Salamandra siberiana		
<i>Salamandrina terdigitata</i>	Salamandra de anteojos		
<i>Salamandrina perspicillata</i>	Salamandra norteña		
<i>Speleomantes ambrosii</i>	Salamandra cavernícola de Ambros		
<i>Speleomantes flavus</i>	Salamandra de Albo		
<i>Speleomantes genei</i>	Salamandra cavernícola de Gene		
<i>Speleomantes imperialis</i>	Salamandra cavernícola imperial		
<i>Speleomantes italicus</i>	Salamandra cavernícola italiana		
<i>Speleomantes strinatii</i>	Salamandra cavernícola de estrinati		
<i>Speleomantes supramontis</i>	Salamandra cavernícola supramontana		
<i>Speleomantes sarrabusensis</i>	Salamandra cavernícola de Sarrabusa		
<i>Proteus anguinus</i>	Proteo		

7.1.2 Tabla 2. Disponibilidad de Genes 12S, 16S, CytB y NADH

TABLA 2 Tabla de recopilatoria del conjunto de genes disponibles en GenBank para los anfibios de Cataluña.

Espece	Genoma completo	12 S	16 S	Cyt B	NADH
<i>Alytes obstetricans</i>					
<i>Bufo spinosus</i>					
<i>Calotriton arnoldi</i>					
<i>Calotriton asper</i>					
<i>Discoglossus pictus</i>					
<i>Epidalea calamita</i>					
<i>Hyla meridionalis</i>					
<i>Ichthyosaura alpestris</i>					
<i>Lissotriton boscai</i>					
<i>Lissotriton helveticus</i>					
<i>Pelobates cultripes</i>					
<i>Pelodytes punctatus</i>					
<i>Pelophylax perezi</i>					
<i>Rana temporaria</i>					
<i>Salamandra salamandra</i>					
<i>Salamandra salamandra salamandra</i>					
<i>Triturus marmotus</i>					
Disponible					
No disponible					
Disponible pero no se alinean					

7.1.2 Tabla 3. Combinaciones de primers

TABLA 3 Tabla de combinaciones del conjunto de primers testados en las pruebas in silico que han mostrado resultados de amplificación específica para *C. arnoldi*. (Resaltado) primer que ha dado resultados positivos en las PCR realizadas en laboratorio.

Nº	Primer Forward	T ^a PF	Primer Reverse	T ^a PR
1	PF_12S_SG_55	54,8	PR_12S(CG)_55	60
2	PF_12S_SG_55	54,8	PR_12S_SG_55	60,1
3	PF_12S_SG_58	61,7	PR_12S(CG)_55	60
4	PF_12S_SG_58	61,7	PR_12S_SG_55	60,1
5	PF_12S_SG_58	61,7	PR_12S_SG_58	65,3
6	PF_12S_SG_58	61,7	PR_12S_SG_59	65,7
7	PF_12S_SG_59	61,7	PR_12S(CG)_55	60
8	PF_12S_SG_59	61,7	PR_12S_SG_55	60,1
9	PF_12S_SG_59	61,7	PR_12S_SG_58	65,3
10	PF_12S_SG_59	61,7	PR_12S_SG_59	65,7
11	PF_12S_SG_61	64,6	PR_12S(CG)_55	60
12	PF_12S_SG_61	64,6	PR_12S_SG_55	60,1
13	PF_12S_SG_61	64,6	PR_12S_SG_58	65,3
14	PF_12S_SG_61	64,6	PR_12S_SG_59	65,7
15	PF_16S_SG_56	60,1	PR_16S(CG)_55	60
16	PF_16S_SG_57	60,1	PR_16S(CG)_55	60
17	PF_16S_SG_55	56,1	PR_16S(CG)_55	60
18	PF_16S_SG_60	61,3	PR_16S(CG)_55	60
19	PF_16S_SG_63	67	PR_16S(CG)_55	60

7.2. ANEXO II: Figuras

7.2.1. Figura 1. Resultados réplica PCR

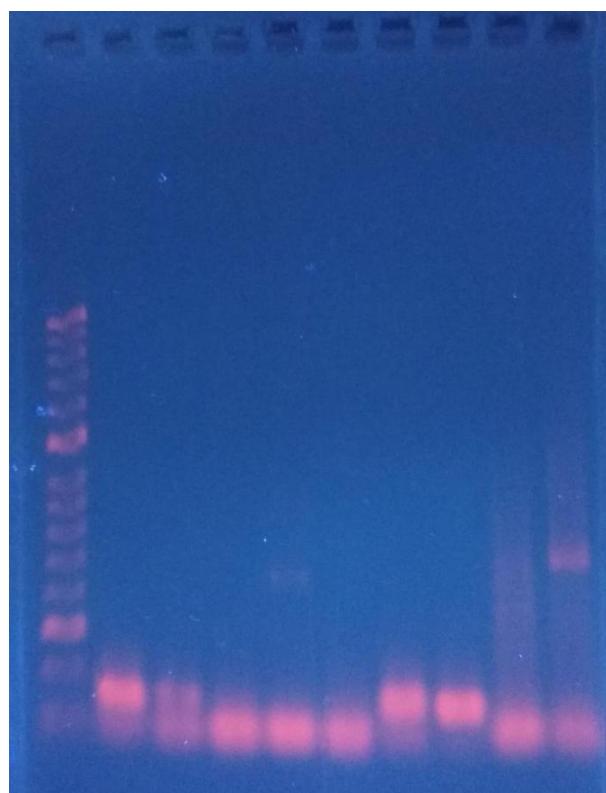


Figura 1 | Gel sanger con las muestras de la replica de la 6^a pareja para (1) *C. arnoldi*, (2) *C. asper*, (3) *S. salamandra*, (4) *T. marmoratus* junto a la réplica de la 13^a pareja (6) *C. asper*, (7) *S. salamandra*, (8) *T. marmoratus*. La prueba se realizó situando un (5) control negativo con primers del para la 6º pareja sin DNA.

7.2.2. Figura 2. Puntos de muestreo: Amplificación de secuencias

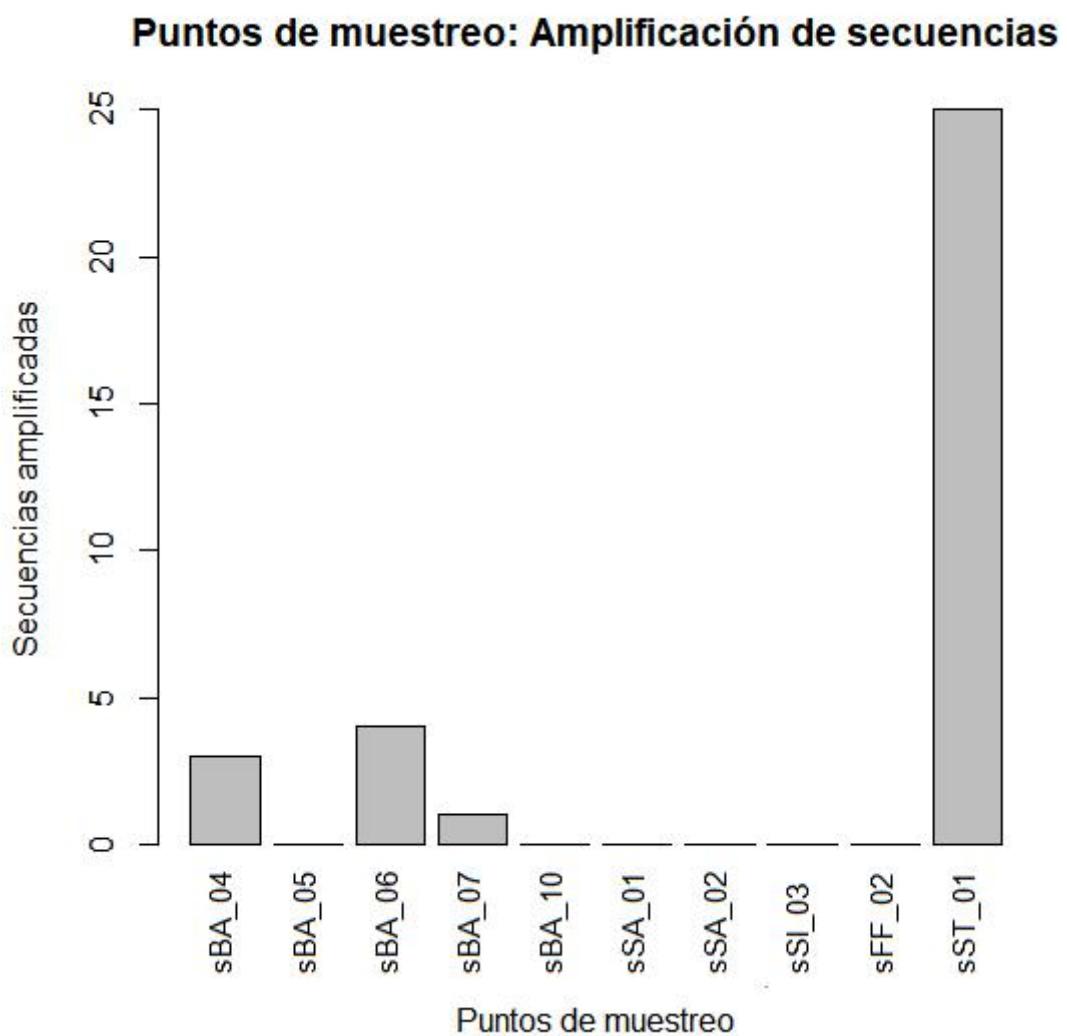


Figura 2 | Comparación de los resultados de amplificación de secuencias del *C. arnoldi* para Metabarcoding mediante primers *cox1* con las localizaciones del Parque Natural del Montseny donde se tiene constancia de la presencia del *C. arnoldi*.

7.2.3. Figura 3. Puntos de muestreo: MDS Metabarcode de sedimentos

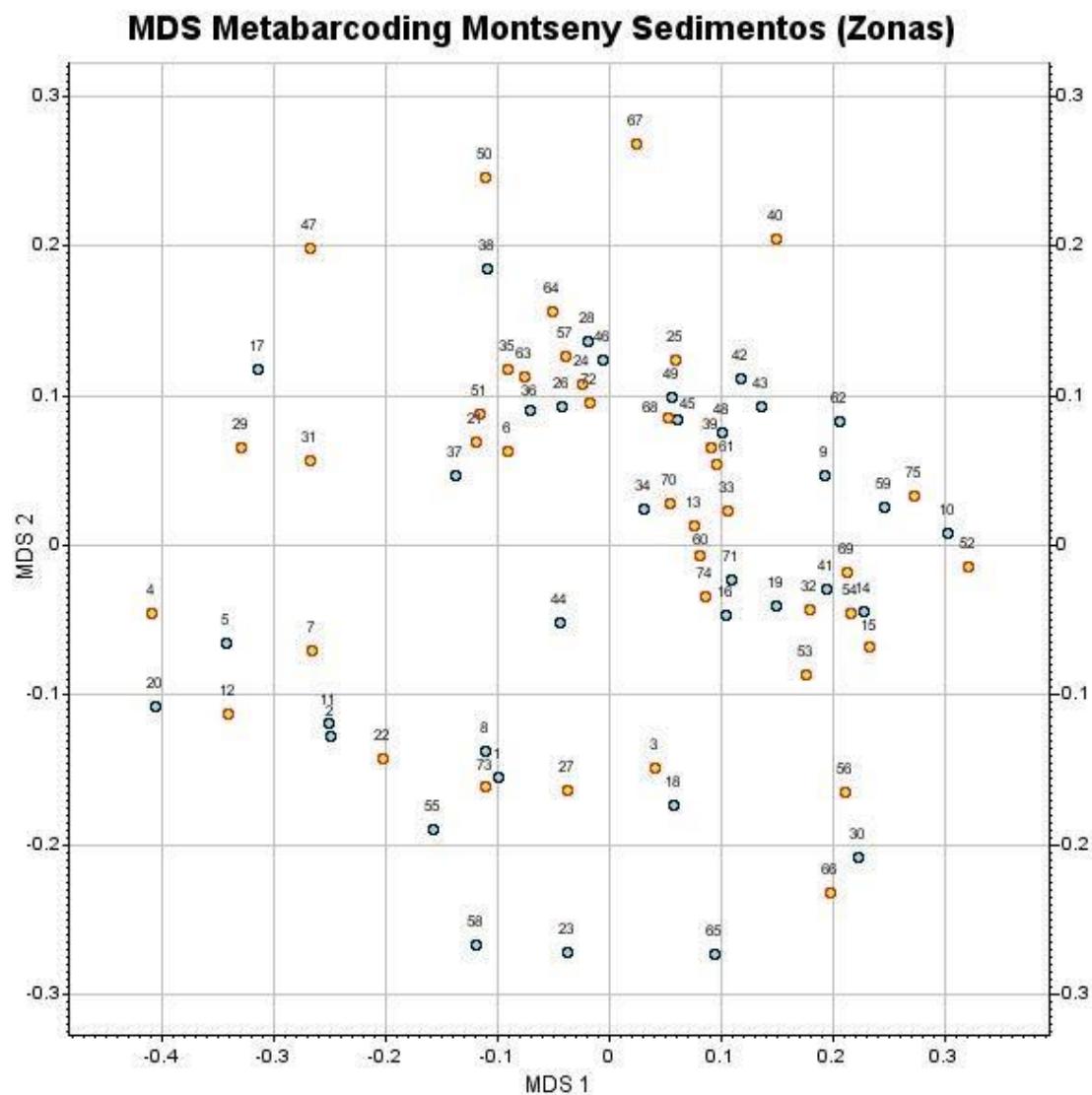


Figura 3 | Comparación de los resultados de amplificación de secuencias del *C. arnoldi* para Metabarcode mediante primers *cox1* con las localizaciones del Parque Natural del Montseny donde se tiene constancia de la presencia del tritón. Muestras donde el *C.arnoldi* se ha detectado (amarillo), puntos sin detección de *C. arnoldi* (azul)

7.2.4. Figura 4. Puntos de muestreo: Diversidad de Shannon

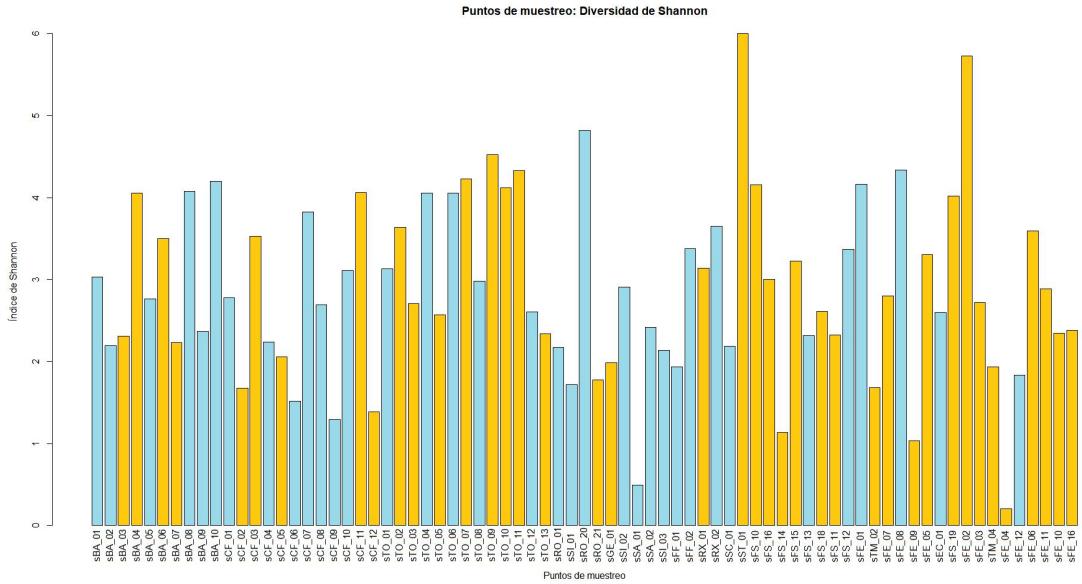


Figura 4 | Comparación de la biodiversidad de Shannon de las muestras de sedimentos del Montseny amplificadas por *cox1* en metabarcode. Muestras donde se ha detectado la amplificación del *C. arnoldi*(amarillo), sin amplificación del *C. arnoldi* (azul).

7.2.5. Figura 5. Puntos de muestreo: Amplificación de secuencias

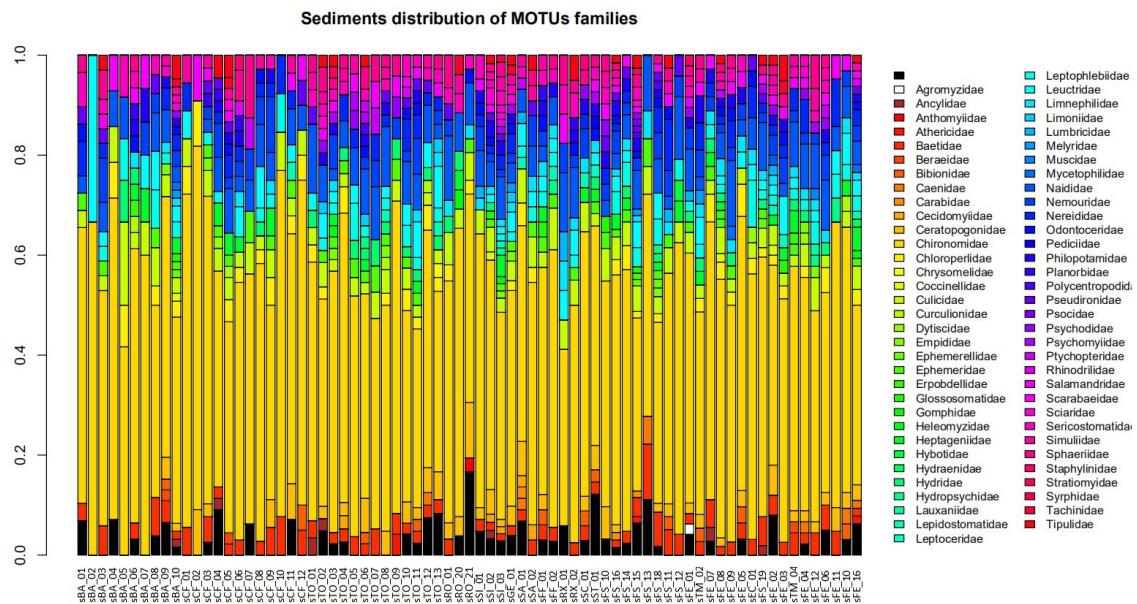


Figura 5 | Comparación de las abundancias relativas, de las familias, de las amplificaciones de cox 1 para los sedimentos de metabarcoding en las muestras del Parque Natural del Montseny.

7.2.6. Figura 6. Comunidades de macroinvertebrados acuáticos

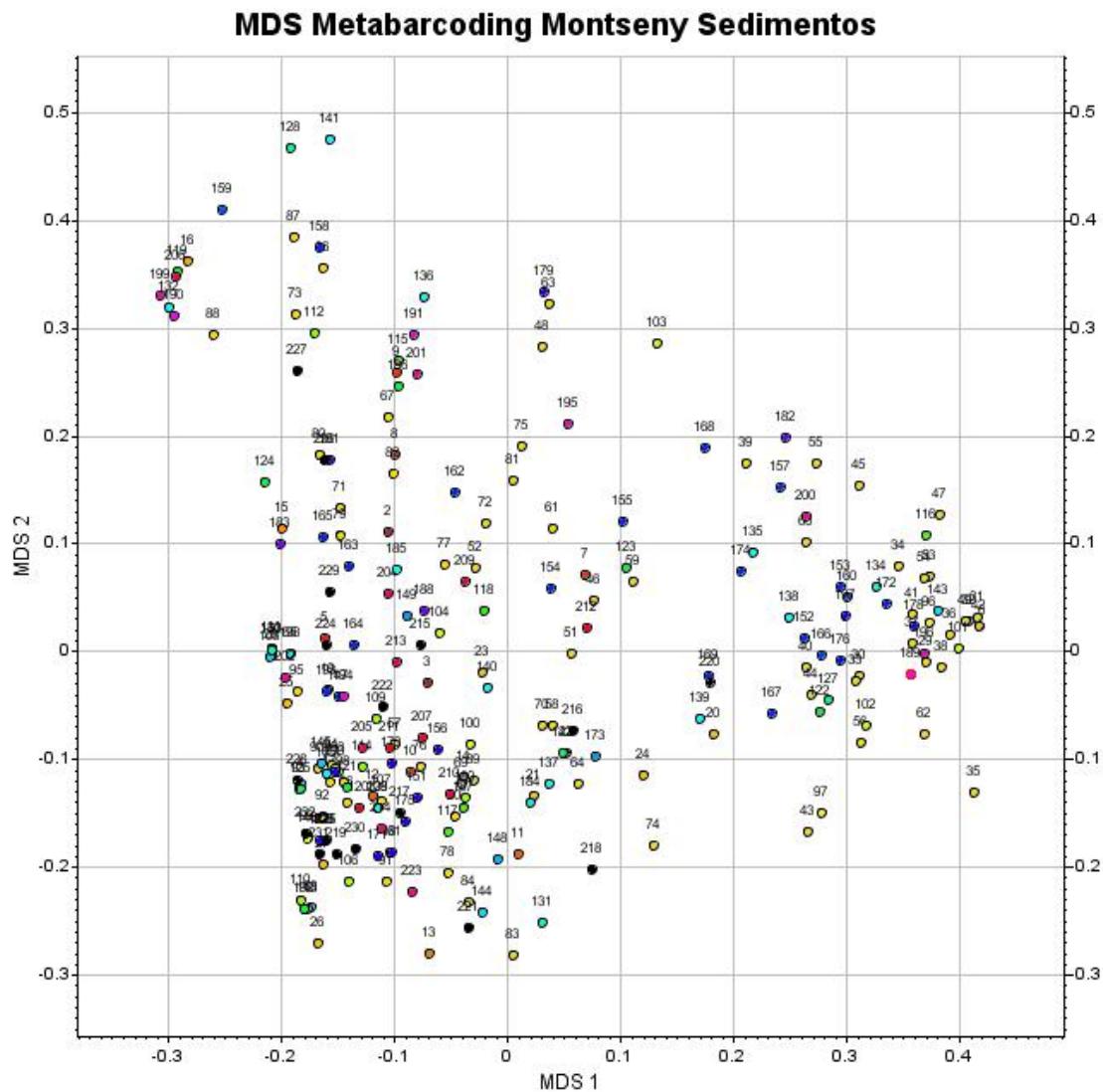


Figura 5 | Comunidades de macroinvertebrados acuáticos amplificados por cox 1 mediante metabarcoding a partir de muestras de sedimentos del Montseny. (1) Agromyzidae, (2-3) Ancyliidae, (4) Anthomyiidae, (5) Athericidae, (6-9) Baetidae, (10) Beraeidae, (11-12) Bibionidae, (13) Caenidae, (14-15) Carabidae, (16-19) Cecidomyiidae, (20) Ceratopogonidae, (29-95) Chironomidae, (96-98) Chloroperlidae, (99) Chrysomelidae, (100) Coccinellidae, (101-105) Culicidae, (106-108) Curculionidae, (109-110) Dytiscidae, (111-114) Empididae, (115) Ephemeralidae, (116) Ephemeridae, (117) Erpobdellidae, (118) Glossosomatidae, (119) Gomphidae, (120-124) Heleomyzidae, (125) Hybotidae, (126) Hydraenidae, (127) Hydridae, (128-129) Hydropsychidae, (130) Lauxaniidae, (131-132) Lepidostomatidae, (133) Leptoceridae, (134) Leptophlebiidae, (137) Leuctridae, (143) Limnephilidae, (145) Limoniidae, (148) Lumbricidae, (149) Melyridae, (150) Muscidae, (151) Mycetophilidae, (152-165) Naididae, (166-171) Nemouridae, (172-175) Nereididae, (176) Odontoceridae, (177) Pediciidae, (178-179) Philopotamidae, (180) Planorbidae, (181) Polycentropodidae, (182) Pseudironidae, (183) Psocidae, (184-185) Psychodidae, (186-187) Psychomyiidae, (188) Rhinodrilidae, (189)

Salamandridae, (190) Scarabaeidae, (191-194) Sciaridae, (195-196) Sericostomatidae, (197-199) Simuliidae, (200-202) Sphaeriidae, (203-204) Staphylinidae, (205) Stratiomyidae, (206) Syrphidae, (207-208) Tachinidae, (209-214) Tipulidae, (215-233) No identificada. Los colores siguen el mismo patrón de la leyenda de la Figura 5.

