



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**“MELANISMO EN ANFIBIOS Y SU
RELACIÓN CON LA CALIDAD
AMBIENTAL”**

**“AMPHIBIAN´S MELANISM AND ITS
RELATIONSHIP WITH THE
ENVIRONMENTAL QUALITY”**

Autor: Miguel Ripoll Fernández

Tutor: Eloy Becares Mantecón, Luis Albero
Martínez

GRADO EN BIOLOGÍA

Julio, 2023



Índice

1. Introducción	1
2. Material y métodos	2
2.1. Fotos de las diferentes especies	2
2.2. Edición de imágenes. Cuantificación del melanismo	3
2.3 Análisis estadístico	5
3. Resultados	6
4. Discusión	18
5. Conclusiones	20
6. Referencias bibliográficas	21
7. Anexos	22



Resumen

La importancia de los ecosistemas lacustres está teniendo gran repercusión en la literatura científica, convirtiéndose en ecosistemas necesarios a proteger, siendo clave para los estudios de calidad ambiental a medida que la crisis climática se hace más latente. Dentro de las comunidades que los conforman, los anfibios son excelentes bioindicadores para dichos estudios dada su gran sensibilidad. Una de las características que podrían ser indicadoras de la calidad del ecosistema es su grado de melanismo, siendo este aspecto poco tratado en la literatura. En este trabajo se estudia el grado de melanismo y su posible relación con la calidad de diferentes lagunas localizadas en zonas agrícolas de la provincia de León, España. Los resultados muestran diferencias significativas entre las especies y entre lagunas, de manera que el melanismo ha estado relacionado en cierta manera con las características paisajísticas y las físico-químicas. Sin embargo, el escaso número de lagunas estudiadas impiden generalizar los resultados. A pesar de las limitaciones, los resultados sugieren que el melanismo es el resultado de un proceso de adaptación evolutivo.

Palabras clave: anfibios, calidad ambiental, correlación, características paisajísticas, melanismo, selección direccional.

Abstract

The importance of lake ecosystems is having a great impact on the scientific literature, becoming necessary ecosystems to protect, being key to environmental quality studies as the climate crisis becomes more latent. Within the communities that make them up, amphibians are excellent bioindicators for such studies given their great sensitivity. One of the characteristics that could be indicative of the quality of the ecosystem is its degree of melanism, this aspect being little treated in the literature. This paper studies the degree of melanism and its possible relationship with the quality of different lagoons located in agricultural areas of the province of León, Spain. The results show significant differences between species and between lagoons, so that melanism has been related in some way to landscape and physicochemical characteristics. However, the small number of lagoons studied make it impossible to generalize the results. Despite the limitations, the results suggest that melanism is the result of an evolutionary adaptation process.



Keywords: amphibian, correlation, directional selection, environmental quality, landscape characteristics, melanism.

1. Introducción

La acción humana está teniendo todo un repertorio de efectos negativos sobre los ecosistemas a nivel global. Uno de los más afectados son los acuáticos, siendo de especial interés, los lacustres. Dichos ecosistemas están sujetos a toda clase de estreses: contaminación por pesticidas, regadío, fluctuaciones en las temperaturas, entre otros, convirtiéndolos en unidades experimentales perfectas para estudios de calidad ambiental.

Sin ir más lejos en nuestro país, España, los ecosistemas acuáticos continentales lacustres son muy diversos, por lo general de pequeño tamaño y están incluidos en cuencas hidrográficas muy grandes, a menudo dependientes de aguas subterráneas y sujetos a intensas fluctuaciones hídricas, relacionadas con el balance hídrico local, que afectan al funcionamiento ecológico. La importancia internacional de nuestros lagos deriva de los siguientes aspectos: 1º) Las características climáticas, geológicas, fisiográficas, hidrológicas y paisajísticas de la Península Ibérica, que hacen que España posea la mayor diversidad de sistemas acuáticos continentales de Europa; 2º) Existe un alto número de humedales reconocidos internacionalmente, 49 de ellos están incluidos en la lista del Convenio Ramsar; 3º) Nuestros lagos son en su mayoría distintos de los europeos templados y fríos, con multitud de lagos endorreicos y ecosistemas temporales, así como con floras y faunas singulares y muy específicas. Con un gran nivel de certeza se puede asegurar que el cambio climático y la actividad humana harán que parte de estos ecosistemas pasen de ser permanentes a estacionales, incluso amenazando con su total desaparición (Álvarez *et al.*, 2006). Dentro de estos ecosistemas, los estanques mediterráneos en paisajes agrícolas han sido poco estudiados. Estos típicamente difieren de los ambientes comparativamente estables de los estanques templados en su marcada estacionalidad, con cambios fuertes y en gran medida impredecibles en el hidroperiodo a través de las estaciones y los años, además de su fuerte exposición a diferentes estreses, ya antes mencionados; con especial énfasis en la intensificación agrícola, que se ha asociado con la disminución de la biodiversidad y la fragmentación del hábitat (Albero *et al.*, 2021).



Dentro del conjunto de comunidades que los habitan, los anfibios son de los grupos funcionales más sensibles, catalogándose como excelentes bioindicadores (Suárez y Fernanda, 2017), ya que tienen una respuesta rápida al estrés ambiental tanto a nivel local como de paisaje; por lo tanto, son vulnerables a la contaminación terrestre y acuática (Santos *et al.*, 2021).

A pesar de existir un reducido número de literatura científica que lo trate, uno de los indicadores que podrán ser más reveladores de la calidad del medio es la pigmentación de su piel, concretamente, el melanismo. El melanismo es la aparición de individuos que tienen una pigmentación más oscura, ya sea como polimorfismos dentro de la especie o como una variación constante entre especies estrechamente relacionadas. El papel del melanismo en los ectotermos a menudo ha sido difícil de determinar porque existen varias hipótesis que pueden explicar su aparición. Entre estas, la termorregulación (referida como melanismo térmico), protección contra la radiación ultravioleta e incluso radiactiva, plasticidad ambiental, coloración críptica, aposematismo, la resistencia a enfermedades y la selección sexual son algunas de las más destacadas. (Trullas *et al.*, 2007; Alho *et al.*, 2010; Sanabria *et al.*, 2014; Burraco y Orizaola, 2022).

Un estudio reciente encontró una relación significativa entre el melanismo de ciertos anuros y el grado de contaminación radiactiva en la zona de Chernóbil (Burraco y Orizaola, 2022) lo que supone una de las primeras evidencias de que el melanismo podría ser un indicador de la calidad del medio. Basándose en esta hipótesis, en este estudio se pretende analizar el grado de melanismo de diversas poblaciones de anfibios en lagunas localizadas en zonas de cultivo de la provincia León y estudiar su posible relación con la calidad ambiental, definida por sus características físico-químicas y por otras variables paisajísticas.

2. Material y métodos

2.1. Fotos de las diferentes especies

Dadas las dificultades y limitaciones para la realización del estudio, el cotutor del trabajo Luis Albero, experto en anfibios, otorgó un total de 591 fotos (número el cuál se fue reduciendo en función de su calidad para su posterior análisis) de diferentes especies de anfibios tomadas

durante la primavera de 2022; comprendiendo un total de 6 especies, incluyendo taxones tanto del orden Anura como Caudata (Fig. 1): *Hyla molleri*, ranita de San Antonio (1); *Pelophylax perezi*, rana común (2); *Triturus marmoratus*, tritón jaspeado (3); *Pleurodeles waltl*, gallipato (4); *Pelobates cultripipes*, sapo con espuelas (5) y *Epidaela calamita*, sapo corredor (6). Cabe destacar que también se muestreo *Bufo spinosus* (sapo común ibérico), pero debido a que solo se encontró 1 individuo, no fue incluido en el estudio.

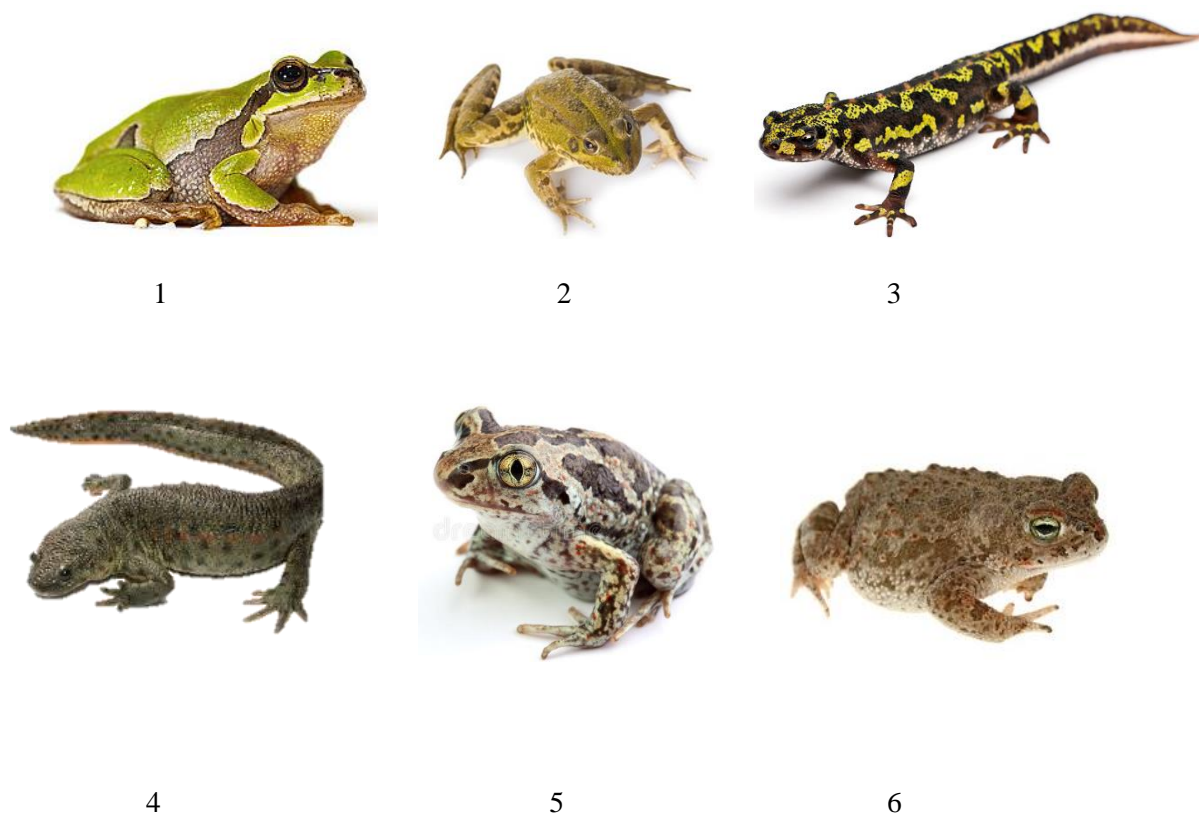


Figura 1: Imágenes del conjunto de especies tratadas en el estudio.

2.2. Edición de imágenes. Cuantificación del melanismo

Para poder analizar el grado de melanismo de cada uno de los individuos, se utilizó el programa de edición de fotos Photoshop en su versión más actualizada de la siguiente manera: Todas las fotos fueron filtradas a escala de grises y delimitadas a sólo el individuo para determinar con mayor exactitud los tonos oscuros. Esta selección otorga una información en píxeles en una



escala de 0 (negro) a 255 (blanco) cuyo valor se veía reflejado en un histograma. El valor numérico obtenido fue translocado a una escala porcentual respecto al total de píxeles para finalmente restárselo al total de oscuridad (100%) obteniendo así, de una forma sencilla, el porcentaje de melanismo, tal y como se muestra en el siguiente ejemplo:

Tabla 1: Ejemplo del cálculo del grado de melanismo para un individuo de *Hyla molleri*.

Especie	Promedio de píxeles (0-255)	% sobre 100	Grado de oscuridad (%)
<i>Hyla molleri</i>	91,43	35,85	64,15

El análisis de melanismo se hizo sobre la zona dorsal en el caso de los anuros y en la zona ventral en el caso de los urodelos, donde era más evidente la variación cromática (Fig. 2).



Figura 2: Variación cromática de *Pelophylax perezi* y *Triturus marmoratus*.



Como es evidente, todos los individuos tienen un cierto grado de oscuridad con diferentes valores y ninguno es claro en su totalidad, de lo contrario serían albinos. Por ello, para este estudio, consideraremos melanísticos aquellos individuos que iguallen o superen el valor umbral del segundo cuartil:

Tabla 2: Valores mínimos y máximos de oscuridad de cada especie, así como sus respectivos cuartiles.

Especie	MIN	Cuartiles			MAX
		Q1	Q2	Q3	
<i>Epidaela calamita</i>	67,75	77,31	80,87	84,18	90,81
<i>Hyla molleri</i>	56,32	63,19	70,46	76,63	88,93
<i>Pelobates cultripes</i>	55,29	79,53	83,54	87,72	94,46
<i>Pelophylax perezi</i>	62,14	82,35	85,22	88,90	94,52
<i>Pleurodeles waltl</i>	61,78	73,41	81,82	85,02	87,07
<i>Triturus marmoratus</i>	67,10	77,20	82,57	86,11	89,64

2.3 Análisis estadístico

Naturalmente, para poder atribuir significancia al conjunto de datos y una aplicación al trabajo, el uso de programas estadísticos es indispensable. Los programas utilizados fueron Excel y Past.

En primer lugar, se comparó las especies en las distintas lagunas, realizando tanto un boxplot como histogramas para reflejar las posibles diferencias tanto entre especies como entre lagunas. Los resultados del muestreo fueron en algunos casos muy limitados: aparecían muy pocos o ningún individuo (Anexo, tabla 7). Esta falta de datos traía consigo el incumplimiento de la normalidad y heteroscedasticidad, impidiendo hacer ANOVA (Análisis de Varianza) para la mayoría las especies, con lo que también se utilizó la variante no paramétrica de Kruskal-Wallis.

A continuación, se determinó la similitud entre las lagunas en función de sus características, tanto físico-químicas como paisajísticas, mediante el índice de similitud de Bray-Curtis. Inicialmente, las lagunas de interés fueron la laguna Eras (ERA), Gente (GENT), Pozo Aguja (POAG), Quintana (QUIN) y Mayo (MAYO), pero dado la posterior falta de datos físico-



químicos de POAG, se descartó del análisis final. Para ver si existía alguna correlación entre cada una de las características ambientales respecto al melanismo, se realizó una prueba de Spearman (recordemos que no todos los datos seguían una distribución normal). Las características ambientales analizadas se exponen más adelante en las tablas 3 y 4.

Por último, se efectuaron diferentes técnicas multivariantes para comprobar las relaciones entre todas las variables del estudio, siendo este un acercamiento más exacto a la realidad de un ecosistema. Las técnicas empleadas fueron análisis de componentes principales (PCA) para factores que tuvieran diferentes unidades, como fue el caso de los componentes físico-químicos y las características paisajísticas; y un análisis de correspondencias canónicas (ACC) que permitía relacionar a través de un gradiente ambiental la parte biótica y abiótica.

3. Resultados

El análisis de los datos revela la existencia de variabilidad cromática con diferencias significativas tanto a nivel de orden y de especies como para cada individuo muestreado (Fig. 3): *Pelophylax perezi* es la más oscura entre los anuros y dentro de las especies muestreadas, mientras que *Triturus marmoratus* de los urodelos. En conjunto, *Hyla molleri* es la menos “melanística” dentro de las 6 especies muestreadas, aunque este resultado puede haberse visto influenciado por el reducido número de muestras de esta rana (Anexo, tabla 8). No obstante, puede dejar paso a estudios taxonómicos y evolutivos que puedan resaltar dicha diferencia entre órdenes.

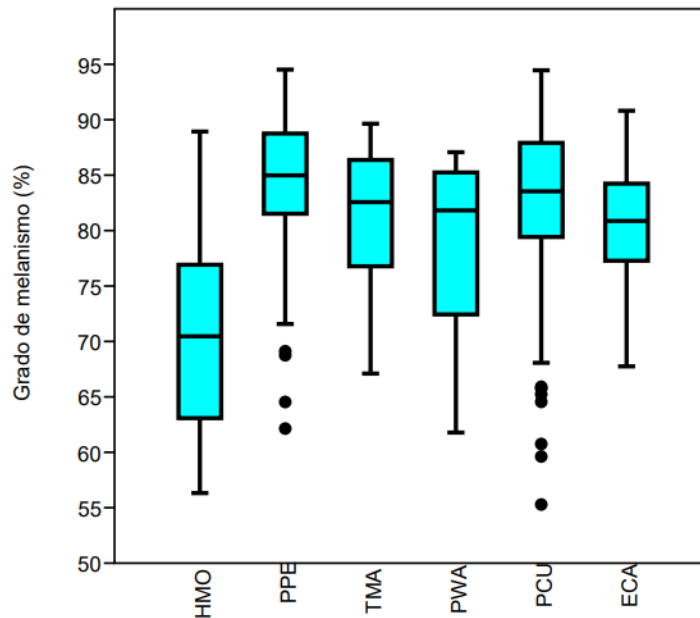


Figura 3: Boxplot del grado de melanismo entre las diferentes especies. Los círculos representan outliers. Los nombres de las especies aparecen con abreviaturas: *Hyla molleri* (HMO), *Pelophylax perezii* (PPE), *Triturus marmoratus* (TMA), *Pelobates cultripis* (PCU), *Pleurodeles waltl* (PWA) y *Epidaela calamita* (ECA).

Los histogramas resultantes (Fig. 4) se ajustaron a una distribución normal (test de Kruskal-Wallis), siendo *Pelophylax perezii* la única especie que cumplía los requisitos para hacer un Análisis de Varianza. Se observa la frecuencia de los distintos porcentajes de melanismo entre cada individuo por especie, en la que se refleja un amplio espectro, siendo en algunas especies casi uniforme, como *Hyla molleri* y en otras incluso con cambios radicales, como *Pleurodeles waltl* o *Pelobates cultripis*, mostrando diferencias tanto interespecíficas como intraespecíficas.

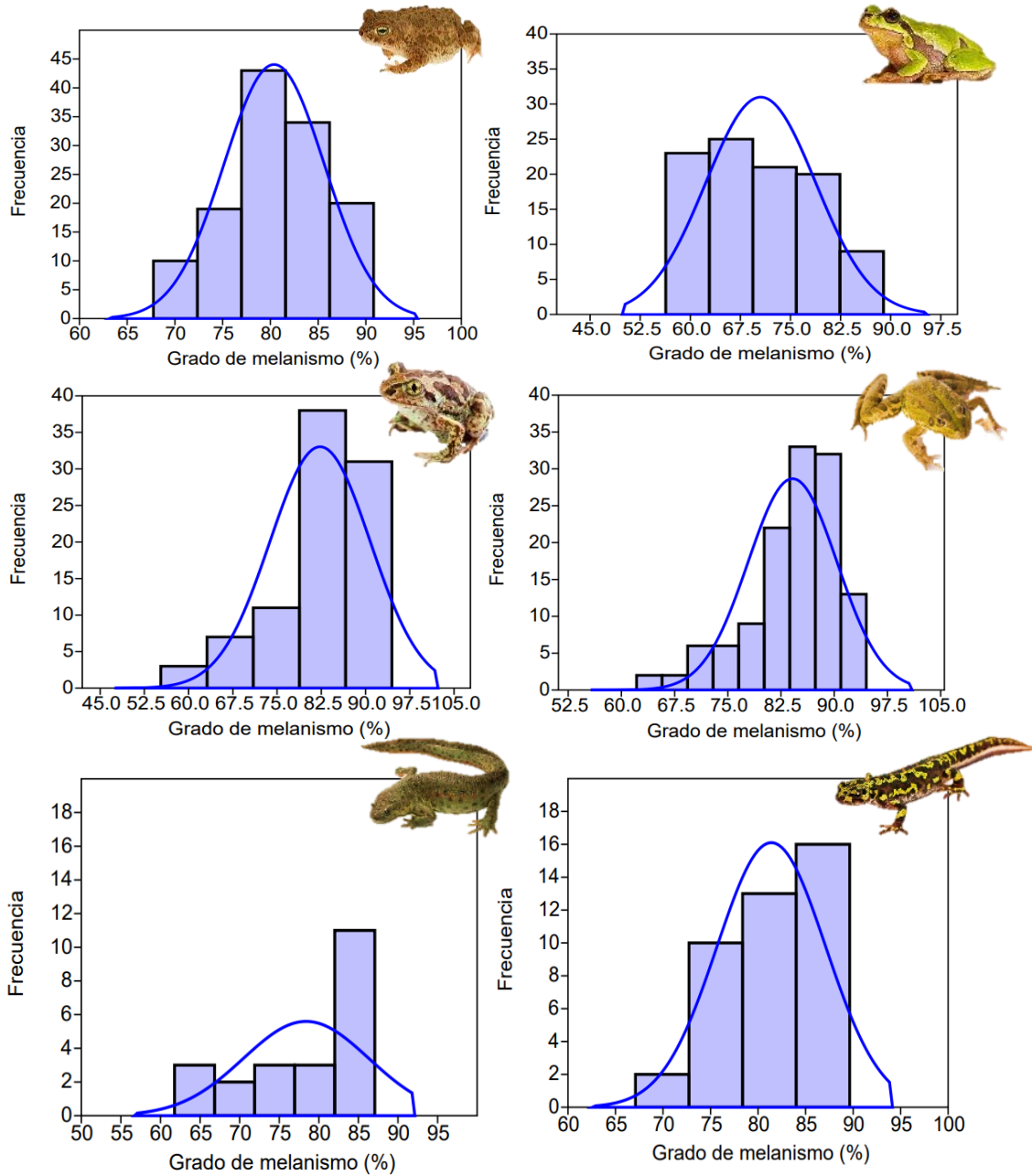


Figura 4: Histogramas de la frecuencia del grado de melanismo de cada especie. De izquierda a derecha y de arriba abajo, se indican las especies y su nivel de significación para el ajuste a una distribución normal: *Epidaela calamita* ($p=1,6 \times 10^{-4}$), *Hyla molleri* ($p=8,1 \times 10^{-3}$), *Pelobates cultripipes* ($p=1,5 \times 10^{-4}$), *Pelophylax perezi* ($p=4 \times 10^{-4}$), *Pleurodeles waltl* ($p=9 \times 10^{-4}$) y *Triturus marmoratus* ($p=1,5 \times 10^{-4}$).



En cuanto a las características de las variables ambientales que pudieran estar relacionadas con el nivel de melanismo, en las tablas 3 y 4 se presentan las características más importantes y los valores medios para cada laguna. Se incluyen también las características morfológicas de las lagunas estudiadas. Algunas características son indicadores del grado de calidad ambiental y estrés al que pueden verse sometidas las poblaciones de anfibios. Una escasa profundidad refleja la temporalidad potencial de la laguna, la proporción de helófitos es indicadora de la capacidad de refugio frente a los depredadores, El resto de variables del paisaje son una medida indicadora de la calidad del medio que rodea la laguna, lo que facilita el desarrollo de las especies más terrestres, o por el contrario un mayor impacto potencial de la actividad agrícola sobre las lagunas.

Tabla 3: Parámetros paisajísticos con sus respectivas unidades. Las proporciones de las variables paisajísticas (helófitos, plantaciones, pradera, humedales, robledales, superficies artificiales, suelo descubierto y cobertura arbustiva), y los tipos de cultivo (secano o regadío) se expresan en un intervalo de 0 a 100.

Laguna	ERA	GENT	MAYO	QUIN
Área (m ²)	7974	11290	19441	1360
Profundidad media (cm)	110	94	35	130
Proporción de helófitos	10,87	14,29	6,96	45,80
Bosques artificiales/plantaciones	2,45	1,59	0,13	1,34
Pradera	36,60	30,54	9,91	45,70
Humedales cercanos	0,35	3,36	1,21	0,57
Bosque de roble natural	3,20	1,32	0,09	7,66
Superficies artificiales	13,28	7,98	16,35	6,76
Suelo descubierto	1,99	2,17	0	0,06
Arbustada	2,43	0	0	3,60
Cultivos de regadío	4,45	5,24	16,34	1,93
Cultivos de secano	25,06	64,93	61,51	29,36

Otras variables de interés son las características físico-químicas del agua. En este caso el valor de nitrógeno y fósforo da una idea del grado de eutrofización de las lagunas. La conductividad es indicadora del grado de temporalidad y salinización del sistema. El resto de valores de iones sirven para caracterizar la composición físico-química de la laguna, pero no están relacionadas con la calidad del medio.



Se incluye en la tabla los valores medios del melanismo para cada especie, dado que son los datos base que han sido utilizados para analizar las relaciones entre las variables estudiadas y el grado de melanismo.

Tabla 4: Características físico-químicas de las lagunas junto con la media de melanismo de cada especie.

Laguna	ERA	GENT	MAYO	QUIN
Longitud	3205	3175	3167	2790
Latitud	47163	47151	47072	47074
ALCALINIDAD T (meq/L CO ₃ Ca)	1,07	3,12	1,66	1,21
NITRATO (meq/L)	0,47	0,30	0,26	0,10
CLORURO (meq/L)	0,32	2,35	0,46	0,82
SULFATO (meq/L)	0,05	0,04	0,04	0,04
MAGNESIO (meq/L)	1,91	5,81	2,42	2,17
CALCIO (meq/L)	0,34	0,64	0,41	0,40
SODIO (meq/L)	0,89	2,42	1,39	1,15
POTASIO (meq/L)	0,13	0,98	0,13	0,41
ORTOFOSFATO (ug/L P-PO ₄)	0,04	0,12	0,03	0,00
CONDUCT SUP (us/cm)	1,40	4,15	1,98	1,96
<i>H.molleri</i>	61,58	57,73	-	70,87
<i>P. perezii</i>	84,25	89,03	85,80	84,34
<i>T. marmoratus</i>	75,27	85,14	80,61	83,99
<i>P. waltl</i>	80,49	69,86	74,71	82,33
<i>P. cultripis</i>	-	85,39	91,93	77,95
<i>E. calamita</i>	-	-	83,09	80,37

Como se mencionó anteriormente, se compararon dichas características paisajísticas y físico químicas entre lagunas para determinar su grado de similitud (Tabla 5 y Figura 5). Se puede apreciar que son bastante similares entre sí, aunque las pequeñas diferencias pueden ser determinantes para el objetivo del estudio.



Tabla 5: Matriz de los índices de similitud entre las características ambientales de las lagunas.

	ERA	GENT	QUIN	MAYO
ERA	1	0,90	0,93	0,84
GENT	0,90	1	0,96	0,93
QUIN	0,93	0,96	1	0,90
MAYO	0,84	0,93	0,90	1

A la hora de trabajar con técnicas de agrupación, es importante saber las variables que permiten dicha agrupación. Es decir, cuando se clasifican varias entidades, estas se relacionan entre sí por la similitud de algunas de sus variables. En este caso, serán determinantes aquellas que tengan valores numéricos parecidos, tal y como se muestra en la siguiente figura:

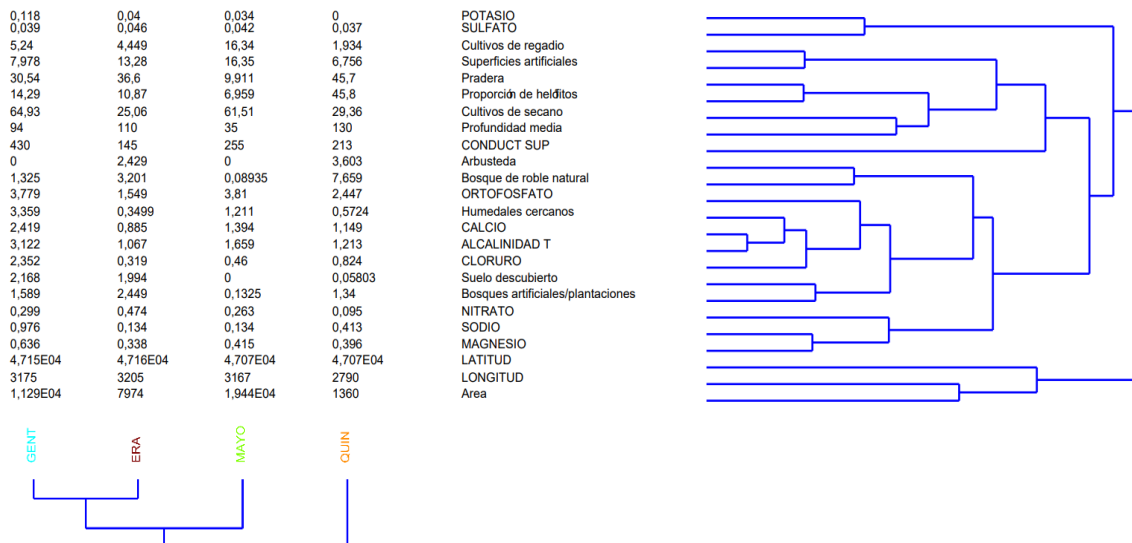


Figura 5: Resultado de la técnica de agrupación en función de la similitud.

A simple vista, y corroborado por el dendrograma (Fig. 5), se puede apreciar que QUIN y MAYO son las lagunas que más difieren en sus características, en especial la primera, mientras ERA y GENT son más parecidas entre sí, lo cual es esperable, dado que están muy próximas geográficamente. No obstante, numéricamente las lagunas son bastante similares entre si (Tabla 5). Las variables determinantes para la agrupación serán aquellas con los valores más altos, que son para cada grupo de lagunas: GENT y ERA: longitud, latitud, pradera, helófitos,



profundidad y suelo descubierto; GENT y MAYO: latitud, nitrato, cultivo de secano, arbusteda, bosque; GENT y QUIN: latitud y bosque; ERA y MAYO: latitud, sodio, humedales y cloruro; ERA y QUIN: latitud, humedales, alcalinidad y magnesio; MAYO y QUIN: calcio, suelo descubierto y bosque. La única común a todas es la latitud, dado que se encuentran en paralelos próximos o idénticos en la meseta de la provincia de León. Sin embargo, veremos que tiene una correlación negativa respecto al melanismo, así como otras aquí citadas (Tabla 6).

De los análisis de correlación entre las variables ambientales y el grado de melanismo (Tabla 6), se detallan las variables a través del valor estadístico (ρ), que nos indica si la correlación es positiva o negativa en caso de existir. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos valores no son significativos, dado que todos mostraron un nivel de significancia superior a 0,05 ($p > 0,05$) en la prueba de Spearman, probablemente debido a la escasez de datos. Aun así, en caso de existir dicha correlación, se obtienen los siguientes supuestos:

Características paisajísticas: Para cada especie: *H.molleri*: hay una correlación muy negativa para el área y las superficies artificiales, y positiva para el resto; *P.perezi*: la única relevante son los humedales, con una correlación muy positiva; *T.marmoratus*: también se ve afectado positivamente por los humedales, estando en el extremo opuesto la presencia de arbustos; *P.waltl*: presenta un patrón similar a *H.molleri* y *P.cultripis*, con correlación negativa para todas excepto para el área y los humedales cercanos; *E. calamita*: presenta correlaciones bajas o negativas para todas, en especial para bosques artificiales y suelo descubierto.

Características físico-químicas: De todas las químicas, el sulfato es la que presenta una correlación más negativa. Entre especies, *H.molleri*, *E.calamita* y *P.waltl* reflejan mayoritariamente correlaciones negativas, mientras que *P.perezi*, *T.marmoratus*, *P.cultripis* lo contrario. Por contraparte, las físicas (longitud y latitud) reflejan una correlación negativa o escasa para todas las especies.

Cultivos: La técnica de regadío es inversamente proporcional a la aparición de melanismo, sobre todo respecto a *H.molleri* y *P.waltl*, mientras que la de secano es totalmente lo contrario para *P.perezi*, *T. marmoratus* y *P. cultripis*. De nuevo, *E. calamita* tiene una correlación positiva escasa y/o muy negativa.



Tabla 6: Resultados de los análisis de correlación entre el melanismo y las diferentes características ambientales a partir de la prueba de Spearman. Se representa el valor estadístico de rho, mostrando el ajuste a una recta de regresión en un rango de valores que oscila de -1 (correlación negativa) a 1 (correlación positiva). Todos presentan un valor de $p > 0,05$, con lo que no son significativos.

Características ambientales	Especie					
	<i>H.molleri</i>	<i>P.perezi</i>	<i>T.marmoratus</i>	<i>P.waltl</i>	<i>P.cultripes</i>	<i>E.calamita</i>
Área(m ²)	-1	0,60	0	-0,80	0,80	0,32
Profundidad media(cm)	1	-0,60	0	0,80	-0,80	-0,32
Proporción de helófitos	0,80	0	0,60	0,40	-0,40	-0,32
Bosques artificiales/plantaciones	0,40	-0,40	-0,20	0	-0,80	-0,95
Pradera	1	-0,60	0	0,80	-0,80	-0,32
Humedales cercanos	-0,60	1	0,80	-0,80	0,80	0,11
Bosque de roble natural	1	-0,60	0	0,80	-0,80	-0,32
Superficies artificiales	-0,80	0	-0,60	-0,40	0,40	0,32
Suelo descubierto	0,20	0,20	0,40	-0,40	-0,40	-0,95
Arbustada	0,95	-0,74	-0,21	0,95	-0,74	-0,06
Cultivos de regadío	-1	0,60	0	-0,80	0,80	0,32
Cultivos de secano	-0,60	1	0,80	-0,80	0,80	0,11
Longitud	-0,20	-0,20	-0,40	-0,40	-0,40	-0,74
Latitud	0,40	-0,40	-0,20	0	-0,80	-0,95
ALCALINIDAD T (meq/L CO ₃ Ca)	-0,60	1	0,80	-0,80	0,80	0,11
NITRATO (meq/L)	-0,20	-0,20	-0,40	-0,40	-0,40	-0,74
CLORURO (meq/L)	0	0,80	1	-0,40	0,40	-0,11
SULFATO (meq/L)	0,26	-0,77	-0,77	0,26	-0,77	-0,54
MAGNESIO (meq/L)	-0,60	1	0,80	-0,80	0,80	0,11
CALCIO (meq/L)	-0,60	1	0,80	-0,80	0,80	0,11
SODIO (meq/L)	-0,60	1	0,80	-0,80	0,80	0,11
POTASIO (meq/L)	0,21	0,63	0,95	-0,32	0,11	-0,39
ORTOFOSFATO (ug/L P-PO ₄)	-0,40	0,40	0,20	-0,80	0	-0,74
CONDUCT SUP (us/cm)	-0,60	1	0,80	-0,80	0,80	0,11

En cuanto a los análisis multivariantes, al trabajar con técnicas de reducción de la dimensionalidad, se debe tener en cuenta el valor de la varianza explicada por cada eje (Tabla 7). Por lo general, y para este estudio, se utilizan los valores de los dos primeros ejes. Estos suman más del 50% de varianza, lo que significa que hay poca pérdida de información. Por lo tanto, se consideran representativos respecto a los datos originales, reflejando una alta significancia de los ejes.



Tabla 7: Resultados de los análisis multivariantes.

	PC	Eigenvalue	% varianza
PCA con factores físico-químicos	1	7	62
	2	4	30
	3	1	9
PCA de todas las características ambientales	1	11	46,49
	2	8	32
	3	5	21,77
PCA del melanismo	1	4	59
	2	2	32
	3	1	9
ACC con todos los parámetros	1	$1,6 \times 10^{-3}$	67,28
	2	6×10^{-4}	26,24
	3	2×10^{-4}	6,48

El primer PCA, en el que se han utilizado los factores físico-químicos (Fig. 6) muestra que la mayoría tienen un mayor impacto, y además con bastante correlación en la laguna GENT, coincidiendo con los valores más altos (Tabla 4), sobre todo los relacionados con la alcalinidad ((3,12 meq/l CO₃Ca), Cloruro (2,35 meq/l) y Sodio (0,97 meq/l)), que a simple vista se puede decir que está muy mineralizada respecto al resto con unos valores de conductividad y un contenido iónico más altos. Esta mayor mineralización probablemente esté relacionada con un proceso de evaporación más alto y una reducción del volumen de agua en la laguna, ya que las características litológicas de la cuenca son muy similares entre todas y además todas ellas se sitúan en un territorio donde los usos del suelo son preferentemente agrícolas.

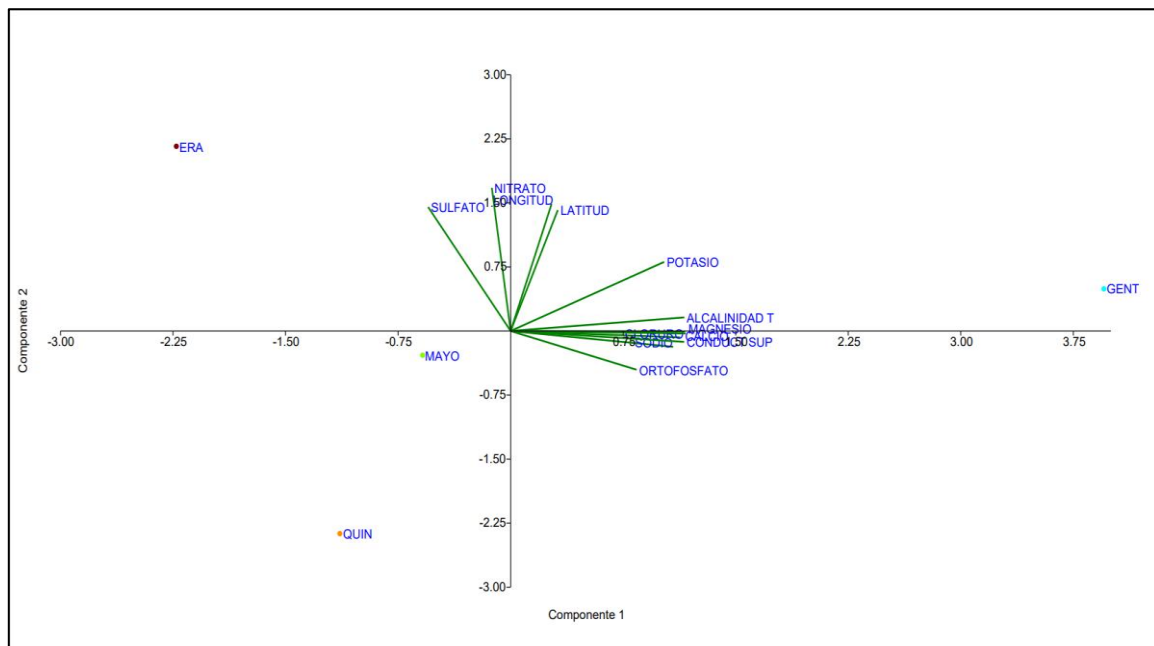


Figura 6: PCA con los factores físico-químicos.

En segundo lugar, en el PCA de las variables ambientales, es decir, paisajísticas más físico-químicas (Fig. 7), la laguna ERA está caracterizada por la ausencia de importancia de dichas variables; en QUIN predominan las características paisajísticas (arbustada, bosques de roble, bosques artificiales, pradera, helófitos y la profundidad); en GENT, una combinación de factores físico-químicos (latitud, sodio, cloruro, magnesio, alcalinidad, potasio, conductividad ortofosfato) y características paisajísticas (suelo descubierto y humedales cercanos); y en MAYOR, sulfato, nitrato, longitud, superficies artificiales, cultivos de regadío y área.

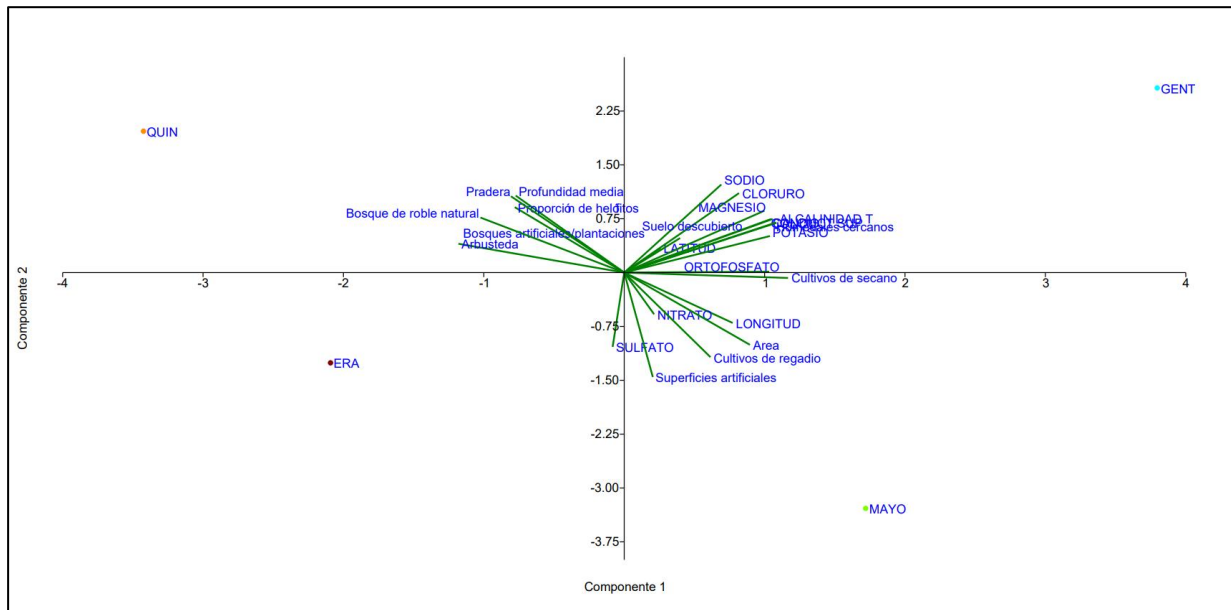


Figura 7: PCA del conjunto de las variables ambientales de las lagunas estudiadas.

De la misma manera, en la figura 8, se presenta el grado de melanismo para cada especie en función de la laguna: *P. waltl* es más melanístico en ERA; *H. molleri* en QUIN, aunque con poco peso; *T.marmoratus* y *P.perezi* en GENT y *P.cultripes* y *E.calamita*, con una gran correlación en MAYO, coincidiendo en cierta manera con los datos individuales de melanismo y los datos medios de melanismo por laguna.

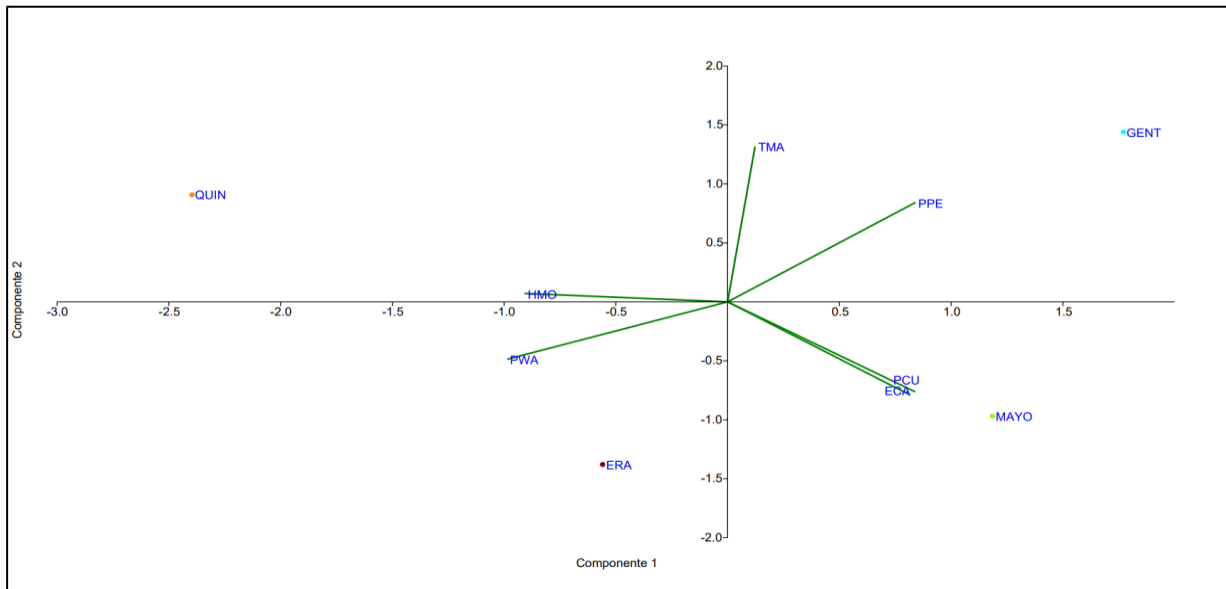


Figura 8: PCA del grado de melanismo en función de la laguna.

Finalmente, el ACC combina todos los datos (Fig. 9). Similar a los análisis de correlación, se observa que *H.molleri* y *P.waltl* se comportan de manera semejante, con dominio de varias características paisajísticas, pero con poco peso en el gallipato; *P.cultripes*, y *T.marmoratus* parecen no verse influenciados por ningún factor, contradiciéndose con los análisis de correlación; *E.calamita* se ve afectada negativamente por varias características ambientales; mientras que *P.perezi* se ve influenciado por un gran número de estas. En definitiva, *P.perezi* es la más afectada por las características ambientales, siendo solo algunas paisajísticas determinantes para *H.molleri* y en menor medida, para *P.waltl*. El melanismo en el resto de las especies parece surgir por razones ajenas a las del estudio.

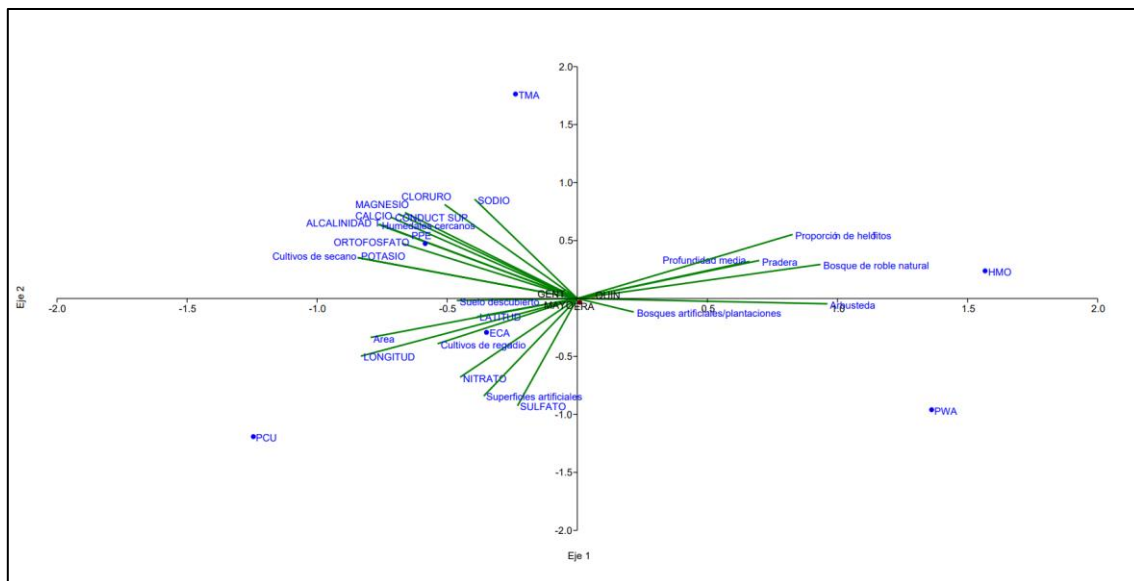


Figura 9: ACC combinando todos los datos. Aquí, la longitud del vector (mayor longitud, más peso), su cercanía al eje (más cerca, menos importancia) y su valor (valores positivos conllevan relación) reflejan su importancia.

4. Discusión

El melanismo no es una característica aislada en anfibios y reptiles, al contrario, está bastante extendido entre algunas especies como *Vipera seoanei* (Víbora cantábrica), reptil peninsular caracterizado por manifestar un número elevado de individuos melanísticos, siendo esta una adaptación (lo más probable) contra la radiación ultravioleta, dada las altitudes en las que vive. Enfocándolo al estudio, una de las hipótesis que pueden explicar el melanismo es una adaptación frente a estreses salinos, siendo determinante por ello la alcalinidad de las lagunas. En hongos, por ejemplo, además de las propiedades anteriormente mencionadas, la melanina puede ayudar a soportar compuestos químicos que estresan a las células, ya que se ha reportado que levaduras con alto contenido en melanina y tolerantes a altas concentraciones de sal, disminuye su capacidad de crecer en ambientes hipersalinos cuando se les aplica inhibidores de la síntesis de melanina (Noyola, 2022) Desgraciadamente, en anfibios, no hay información al respecto.

De entre todas las variables, los resultados de los datos paisajísticos, sugieren que el melanismo puede ser el resultado de una selección direccional que aumentan la frecuencia de los genes del



fenotipo favorecido. Si repasamos los datos vemos que en la laguna QUIN, donde se muestrearon más anfibios, el carácter puede verse favorecido por la proporción de arbustos, de bosques, pradera, helófitos y la profundidad de la laguna, las cuales, a pesar de no tener índices muy altos, todas tienen como denominador común la capacidad de dificultar el paso de la luz y otorgar cobertura; y sumado a que los anfibios suelen tener hábitos nocturnos, ofrecen una ventaja a aquellos individuos más oscuros. Además, el hecho de no encontrar una base genética para esta tendencia observada, indicaría que es causado por plasticidad inducida por el medio ambiente (que puede ser adaptativa o no adaptativa) o por plasticidad ontogenética junto con diferencias geográficas en edad o longevidad (Alho *et al.*, 2010).

Aunque todas las lagunas presentan valores físico-químicos “normales”, un aspecto interesante hubiera sido ver si el grado de contaminación influye en el melanismo. De hecho, y relacionándolo con las sugerencias anteriores, varios investigadores han encontrado evidencia de alteraciones internas de melanina y coloración de la piel debido a contaminantes ambientales. Estos se correlacionan con los efectos genotóxicos que muestran que los contaminantes acuáticos pueden causar daños en la capacidad de adaptación de los animales a su entorno. Tales alteraciones están relacionadas con las alteraciones pigmentarias y la tasa de anormalidad de los eritrocitos, que en conjunto resultan en efectos morfológicos y fisiológicos que pueden comprometer el comportamiento y la supervivencia del organismo (Santos *et al.*, 2021). De hecho, la contaminación puede generar fuertes presiones selectivas que inducen altas tasas de cambio evolutivo (Sanderson *et al.*, 2022).

El estudio de melanismo llevado a cabo sobre especímenes de *Hyla orientalis* (ranita de San Antonio Oriental) por Burraco y Orizaola, (2022), en las zonas próximas a la central nuclear de Chernóbil, afirma que el mantenimiento de la coloración oscura de la piel no se relacionó con los costos fisiológicos en términos de la condición corporal de las ranas o el estado oxidativo, con ausencia de cambios a corto plazo en sus coloraciones. Como citan los autores: “no detectamos una correlación significativa entre las tasas de dosis absorbidas individuales y la pigmentación, lo que sugiere que la coloración más oscura no es inducida por la exposición actual a la radiación” (Burraco y Orizaola, 2022, p. 1474). Se sabe que la coloración oscura



protege contra diferentes fuentes de radiación al neutralizar los radicales libres y reducir el daño al ADN, y en particular, la pigmentación de melanina se ha propuesto como un mecanismo de amortiguación contra la radiación ionizante. Sus resultados sugieren que la exposición a altos niveles de radiación ionizante ha sido, probablemente determinante en el momento del accidente. Es decir, la radiación histórica, puede haber sido seleccionada para una coloración más oscura en las ranas arborícolas de Chernóbil. No obstante, se necesitarían más estudios para determinar los mecanismos subyacentes y las consecuencias evolutivas de los patrones encontrados.

Si nos fijamos en los datos de los cultivos (regadío y secano) vemos que en este caso la mayoría de las lagunas son de secano y tienen cierta correlación con el melanismo en algunas especies (Tabla 6). Los trabajos realizados por Albero *et al.*, (2021), mostraron diferencias significativas entre el tipo de agricultura que rodea los estanques muestreados y sus comunidades de anfibios, mostrando mayor diversidad beta en las de secano. Estas diferencias están relacionadas con el efecto del paisaje (por ejemplo, mayor vegetación natural en el área de secano), pero no con variables locales entre los grupos de manejo. Esto sugiere que la transformación de los cultivos de secano en agricultura de regadío ha resultado en una homogeneización general del paisaje con consecuencias negativas para las comunidades de anfibios. Los efectos negativos del riego, mediados por el aumento del uso de fertilizantes y pesticidas junto con fuertes cambios en la transformación del paisaje, se han descrito en comunidades bióticas asociadas con estanques mediterráneos. Con lo cual, dichas técnicas y homogeneización podrían tener también un efecto negativo sobre el melanismo, siendo esto en parte corroborado por la correlación escasa o negativa respecto a las técnicas de riego en algunas de las especies del estudio (Tabla 6), pero de nuevo, la revisión bibliográfica refleja una escasez de estudios sobre este tema.

5. Conclusiones

La hipótesis inicial planteada sobre la posible correlación entre la calidad de las lagunas y el melanismo no se ve claramente demostrada en este estudio, aceptando como lo más plausible que el melanismo se deba meramente a un proceso evolutivo de selección direccional. No obstante, sería interesante repetir el estudio con un mayor número de individuos y condiciones ambientales. Aun así, este trabajo sirve como base para otros futuros sobre el melanismo en



anfibios, que como se ha podido comprobar, sigue siendo un fenómeno poco estudiado que puede tener implicaciones ecológicas y de calidad ambiental, así como fisiológicas y evolutivas.

6. Referencias bibliográficas

Albero, L., Martínez-Solano, Í., Arias, A., Lizana, M. *et al.* (2021) “Amphibian metacommunity responses to agricultural intensification in a Mediterranean landscape”, *Land*, 10 (9).

Alho, J.S., Herczeg, G., Söderman, F., Laurila, A. *et al.* (2010) “Increasing melanism along a latitudinal gradient in a widespread amphibian: local adaptation, ontogenic or environmental plasticity?”. *BMC Evol Biol*, 10 (317).

Álvarez Cobelas, M., Catalán, J., García de Jalón, D. (2006) “Impactos sobre los ecosistemas acuáticos continentales”, *DIGITAL.CSIC*. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/17749> (Accedido: 6 de mayo de 2023).

Burraco, P. y Orizaola, G. (2022) “Ionizing radiation and melanism in Chernobyl tree frogs”, *Evolutionary Applications*, 9, pp. 1469-1479.

Noyola, P.P. (2022), “Melaninas fúngicas: Aplicaciones en Salud, industria y biorremediación” Disponible en: <https://www3.ugto.mx/eugreka/contribuciones/413-melaninas-fungicas-aplicaciones-en-salud-industria-y-bioremediacion> (Accedido: 8 de mayo 2023).

Sanabria, E.A., Varia, M., Quiroga, L.B., Akmentis, M.S. *et al.* (2014) “Variation of thermal parameters in two different color morphs of a diurnal poison toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae),” *Journal of Thermal Biology*, 41 (1), pp.1-5.

Sanderson, S., Beausoleil, M.-O., O’Dea, R. E., Wood, Z. T. *et al.* (2022). “The pace of modern life, revisited”. *Molecular Ecology*, 31, pp. 1028-1043.

Santos, A.T., Valverde, B.S.L., De Oliveira, C., Franco-Belussi, L. (2021) “Genotoxic and melanic alterations in *Lithobates catesbeianus* (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide”. *Environmental Science and pollution research*, (16).

Suárez, G. y Fernanda, L. (2017). “Reptiles y anfibios como bioindicadores para implementar en estudios de impacto ambiental y planes de manejo ambiental”. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10654/16470>. (Accedido: 29 de abril de 2023).

Trullas, C.S., Van, H.J., Spotila, R.J., (2007) “Thermal melanism in ectotherms”, *Journal of Thermal Biology*, 32 (5), pp. 235-245.



7. Anexos

Tabla 8: Datos melanísticos de cada individuo en cada laguna. Se aplicó un gradiente cromático aproximado para facilitar el manejo de datos y hacerse una idea del oscurecimiento.

Laguna	Especies					
	HMO	PPE	TMA	PWA	PCU	ECA
QUIN	88,93	92,76	89,28	87,07	92,84	90,81
QUIN	87,46	92,13	88,81	87,07	92,62	90,08
QUIN	85,36	90,81	88,69	85,37	92,35	89,76
QUIN	84,92	90,58	88,38	83,31	91,78	89,45
QUIN	84,68	90,14	87,71	82,87	90,19	89,31
QUIN	84,02	89,89	87,41	82,49	88,58	88,87
QUIN	83,86	89,42	87,28	68,11	88,39	88,73
QUIN	82,77	89,04	86,93		87,61	88,23
QUIN	82,49	88,93	86,63		86,84	87,82
QUIN	82,33	88,90	85,53		85,71	87,32
QUIN	81,34	88,90	84,91		85,30	87,29
QUIN	80,65	88,68	84,02		85,23	87,05
QUIN	80,53	88,38	82,95		84,37	86,98
QUIN	80,49	88,19	82,85		83,40	86,68
QUIN	80,09	88,09	82,57		82,65	86,66
QUIN	79,70	87,99	81,82		82,11	86,53
QUIN	79,44	87,91	81,50		81,22	86,51
QUIN	79,37	87,71	79,54		80,89	86,45
QUIN	79,13	87,37	75,85		80,31	86,33
QUIN	79,13	87,34	67,10		80,29	86,25
QUIN	78,45	86,70			80,07	86,04
QUIN	78,24	86,29			79,57	85,91
QUIN	77,95	86,29			77,91	85,91
QUIN	77,74	86,17			76,78	85,65
QUIN	76,64	86,13			76,56	85,35
QUIN	76,60	86,06			74,93	85,15
QUIN	76,49	86,05			73,99	85,10
QUIN	76,26	85,98			73,08	84,91
QUIN	76,20	85,63			72,75	84,84
QUIN	75,09	85,55			71,71	84,41
QUIN	74,93	85,22			71,03	84,37
QUIN	74,91	85,15			70,97	84,19
QUIN	74,73	85,14			68,75	84,16
QUIN	74,67	85,05			68,07	83,92



QUIN	74,59	84,98			65,91	83,91
QUIN	74,01	84,73			65,75	83,80
QUIN	73,99	84,53			65,23	83,77
QUIN	73,78	84,52			64,55	83,59
QUIN	73,71	84,49			60,75	83,55
QUIN	73,63	84,38			59,62	83,38
QUIN	73,47	84,33			55,29	83,13
QUIN	72,22	84,25				82,99
QUIN	72,03	84,14				82,99
QUIN	71,94	84,02				82,62
QUIN	71,87	83,92				82,61
QUIN	71,83	83,80				82,56
QUIN	71,58	83,77				82,56
QUIN	71,40	83,56				82,40
QUIN	70,75	83,52				82,34
QUIN	70,17	83,46				81,99
QUIN	69,28	83,05				81,96
QUIN	69,01	82,96				81,86
QUIN	68,86	82,80				81,73
QUIN	68,32	82,80				81,53
QUIN	68,12	82,61				81,42
QUIN	67,95	82,36				81,28
QUIN	67,62	82,35				81,18
QUIN	67,40	82,23				81,03
QUIN	66,91	82,16				80,99
QUIN	66,33	82,12				80,96
QUIN	65,93	82,09				80,95
QUIN	65,20	81,66				80,88
QUIN	65,08	81,65				80,85
QUIN	64,71	81,39				80,51
QUIN	64,64	80,67				80,40
QUIN	64,35	80,58				80,31
QUIN	64,16	80,45				79,94
QUIN	63,92	79,53				79,88
QUIN	63,80	79,19				79,87
QUIN	63,75	78,78				79,62
QUIN	63,49	78,75				79,51
QUIN	63,37	77,60				79,13
QUIN	63,13	77,37				79,09
QUIN	62,93	76,04				79,03
QUIN	62,82	75,65				78,95



QUIN	62,62	74,25				78,61
QUIN	62,60	72,41				78,60
QUIN	62,56					78,54
QUIN	62,51					78,53
QUIN	62,44					78,53
QUIN	62,37					78,44
QUIN	62,18					78,33
QUIN	61,91					78,31
QUIN	61,48					78,13
QUIN	61,25					77,76
QUIN	61,17					77,66
QUIN	61,14					77,65
QUIN	60,69					77,63
QUIN	60,30					77,58
QUIN	59,61					77,56
QUIN	59,34					77,51
QUIN	59,21					77,51
QUIN	58,54					77,40
QUIN	56,69					77,28
QUIN	56,32					77,28
QUIN						77,04
QUIN						76,61
QUIN						76,42
QUIN						76,39
QUIN						76,38
QUIN						76,34
QUIN						76,21
QUIN						75,62
QUIN						75,57
QUIN						75,44
QUIN						75,23
QUIN						74,75
QUIN						74,56
QUIN						74,14
QUIN						73,80
QUIN						73,44
QUIN						73,17
QUIN						73,01
QUIN						72,89
QUIN						72,37
QUIN						72,05



QUIN						71,55
QUIN						71,55
QUIN						71,08
QUIN						70,29
QUIN						69,89
QUIN						68,85
QUIN						68,59
QUIN						68,17
QUIN						67,75
GENT	57,73	94,52	89,64	79,01	94,46	
GENT		94,40	85,44	72,98	94,45	
GENT		92,58	83,96	70,80	93,61	
GENT		92,45	81,53	64,75	92,24	
GENT		92,27		61,78	91,44	
GENT		91,98			91,05	
GENT		91,92			90,48	
GENT		62,14			90,14	
GENT					90,10	
GENT					89,64	
GENT					89,16	
GENT					87,75	
GENT					87,47	
GENT					87,45	
GENT					87,31	
GENT					87,10	
GENT					87,09	
GENT					86,97	
GENT					86,56	
GENT					86,33	
GENT					85,85	
GENT					85,79	
GENT					85,53	
GENT					85,24	
GENT					84,62	
GENT					84,51	
GENT					84,02	
GENT					83,62	
GENT					83,46	
GENT					83,24	
GENT					83,07	
GENT					82,44	



GENT					82,44	
GENT					82,40	
GENT					81,89	
GENT					81,59	
GENT					81,47	
GENT					81,21	
GENT					81,04	
GENT					80,81	
GENT					80,47	
GENT					79,52	
GENT					79,13	
GENT					77,92	
GENT					70,61	
ERA	64,15	91,73	78,70	85,75		
ERA	59,00	91,12	78,70	85,38		
ERA		91,02	77,98	85,20		
ERA		91,01	76,36	84,48		
ERA		90,30	74,36	83,24		
ERA		90,29	74,25	81,15		
ERA		90,28	73,69	78,64		
ERA		90,11	73,08	74,93		
ERA		90,00	72,99	65,63		
ERA		89,70	72,59			
ERA		89,38				
ERA		89,33				
ERA		88,83				
ERA		88,55				
ERA		88,38				
ERA		88,36				
ERA		88,21				
ERA		87,84				
ERA		85,58				
ERA		84,65				
ERA		75,64				
ERA		74,38				
ERA		73,24				
ERA		72,67				
ERA		72,64				
ERA		72,25				
ERA		69,12				
ERA		64,54				



MAYO		87,07	86,11	74,71	92,83	83,09
MAYO		86,58	84,78		92,42	
MAYO		84,93	83,17		91,78	
MAYO		84,62	80,35		90,69	
MAYO			79,04			
MAYO			77,20			
MAYO			73,63			