

## ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA ANTE EL CAMBIO GLOBAL. LAS ESPECIES DE EFEMERÓPTEROS Y PLECÓPTEROS DEL PARQUE NACIONAL DE AIGÜESTORTES COMO PARADIGMA

MARÍA ÁNGELES PUIG<sup>1</sup>, NICOLÁS UBERO-PASCAL<sup>2</sup>, VALENTINA AMORE<sup>1,3</sup> Y ROMOLO FOCHETTI<sup>3</sup>

### RESUMEN

Se han capturado 35 especies de Efemerópteros y 50 especies de Plecópteros en 32 estaciones de muestreo pertenecientes a 7 cuencas fluviales del Parque Nacional y del Pre-Parque. De las especies capturadas, 2 son relictas, 3 endemismos ibéricos, 1 género (*Pachyleuctra*) y 9 especies son endemismos pirenaicos.

Se ha observado que el aumento de 2,5° C de la temperatura media anual del aire registrado entre 1978 y 1994 en esta zona de Pirineos ha permitido la migración aguas arriba de especies como *Alainites muticus*, desplazándose el límite superior de su rango altitudinal de 1.500 m hasta 2.400 m. Se constata la rapidez de los cambios asociados al aumento de la temperatura para macroinvertebrados acuáticos con adultos voladores.

Se ha comprobado que son pocas las especies de plecópteros que poseen hemocianina en la hemolinfa, tratándose principalmente de depredadores de las familias Perlidae y Perlodidae. En este proyecto se ha demostrado por primera vez que la síntesis de la hemocianina se activa ante la reducción del oxígeno disuelto en las aguas en que habitan. También se ha comprobado que esta síntesis es una estrategia fisiológica que utilizan junto con estados de letargo/diapausa.

Los estudios moleculares de las especies de *Rhithrogena* han permitido confirmar la identidad de algunas especies y señalar que algunos morfotipos no se corresponden genéticamente con las especies a las que pertenecen. En estos casos será preciso cerrar los ciclos biológicos mediante cría en el laboratorio para poder correlacionar morfológicamente los diferentes estados (huevo, ninfa y adulto) y proceder a la descripción de nuevas especies si fuera necesario.

Los estudios moleculares en plecópteros, nos han permitido realizar una primera aproximación a la filogenia de *Pachyleuctra*, así como caracterizar varias especies endémicas de *Isoperla* y *Leutra*. El estudio del aislamiento de las poblaciones de *Arcynopteryx compacta* ha demostrado que distancias muy pequeñas son suficientes para que las poblaciones estén aisladas.

Las puestas de especies clave en el funcionamiento de los ríos de alta montaña, así como de especies emblemáticas, que se depositan en zonas sensibles ante la sequía tienen huevos con estructuras coriónicas compactas que les permitirían «a priori» soportar períodos de desecación.

<sup>1</sup> Biogeodynamics and Biodiversity Group, Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CEAB-CSIC), Accés Cala Sant Francesc 14, 17300-Blanes, Girona. Teléfono: 34 972336101; e-mail: [puig@ceab.csic.es](mailto:puig@ceab.csic.es)

<sup>2</sup> Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100-Murcia. Teléfono: 34 968364960; e-mail: [nubero@um.es](mailto:nubero@um.es)

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Ambientale, Università della Tuscia, Viterbo, Italia. E-mail: [fochetti@unitus.it](mailto:fochetti@unitus.it), [valamore@unitus.it](mailto:valamore@unitus.it)

La mayoría de las especies estudiadas tienen dietas mixtas o un amplio rango de presas consumibles.

Sería recomendable una gestión de caudales en los ríos del parque que contemplase objetivos y requerimientos de conservación de la biodiversidad.

**Palabras clave:** Plecópteros, Efemerópteros, biodiversidad, biología molecular, hemocianina, alimentación, distribución altitudinal, hidrología, cambio climático.

## SUMMARY

35 Mayfly species and 50 Stonefly species have been captured in 32 sampling stations belonging to 7 river basins at the NP-Aigüestortes. Among the species collected 2 are relict, 3 Iberian endemism, and 1 genus (*Pachyleuctra*) and 9 species are Pyrenean endemism.

It has been observed that the increase of 2.5° C of the air annual average temperature registered between 1978 and 1994 in this area of Pyrenees, has caused the migration upstream of species such as *Alainites muticus*, shifted from altitudes of 1,500 m a.s.l. until 2,400 m a.s.l. It can be stressed the speed of the changes associated with the increase of the temperature for aquatic macroinvertebrates with flying stages.

We detected hemocyanin in the hemolymph of very few stonefly species, mainly predators belonging to the families Perlidae and Perlodidae. In this project we have shown hemocyanin synthesis to be active before the reduction of dissolved oxygen in the waters where they live. It has also been verified that this is a physiological strategy used at the same time of diapause phases.

The molecular studies of the *Rhithrogena* species have allowed confirm the identity of some species and noted that some morphotypes do not relate genetically with the species to which they belong. In these cases, it would be to study the biological cycles of specimens through rearing in the laboratory in order to establish the morphological correlation among the immature and mature stages (eggs, nymphs, adults) and proceed to the description of new species, it is necessary.

The molecular studies of Stonefly species, have allowed us to establish the phylogeny of the genus *Pachyleuctra*, and characterize some endemic species of *Isoperla* and *Leutra*. The study of the population isolation of *Arcynopteryx compacta* has shown that short geographical distances are sufficient to enable the populations are isolated.

The egg laying of key species for the structure and function in stream ecosystems of high mountains, as well as emblematic species, which are deposited on areas can be affected by droughts, have eggs with compact chorionic layers that would allow them to dry periods.

Most of the studied species have mixed diets and feeding on a wide range of food resources, or preys.

A best management of river flows in the PN-Aigüestortes is necessary, with conservation objectives for biodiversity recovery and maintenance before the Climatic Change.

**Key words:** Stoneflies, Mayflies, biodiversity, molecular biology, hemocyanin, feeding strategies, altitudinal distribution, hydrology, Climatic Change.

## INTRODUCCIÓN

Que el impacto del cambio climático es un hecho en ecosistemas de montaña y que afecta especialmente a los ecosistemas acuáticos, ya ha sido confirmado en distintos trabajos. SCHNEIDER & HOOK 2010 han medido a nivel mundial un aumento medio de la temperatura superficial del agua en grandes masas continentales en torno a  $1,13^{\circ}\text{C}$  en el período 1985-2009, con valores máximos de hasta  $2,5^{\circ}\text{C}$ . Estos autores también han observado que el calentamiento es mayor en latitudes altas y medias del hemisferio norte, áreas en las que se encuentran situados los Pirineos. De hecho en algunos lugares de Pirineos y según datos de CATALAN *et al.* 2002 para el período 1971-1997, la temperatura atmosférica media ha aumentado  $3,5^{\circ}\text{C}$  en el lago Redò, sito en los alrededores del Parque Nacional d'Aigüestortes y Estany de Sant Maurici (PN-Aigüestortes en adelante). Además las predicciones oficiales de aumento de la temperatura atmosférica en Pirineos proponen un escenario con incrementos de entre  $0,19^{\circ}\text{C}$  y  $0,24^{\circ}\text{C}$  por década durante el presente siglo (SMC 2010).

El cambio climático en ecosistemas fluviales genera un efecto cascada a partir de su impacto sobre el balance hídrico, el cual a su vez incide sobre distintos procesos fluviales (régimen hídrico, estabilidad del canal, estructura del substrato del lecho fluvial, etc) y la calidad del agua, afectando en este caso a todos sus descriptores, especialmente a la temperatura que es un descriptor básico en el presente estudio. Así mismo, la temperatura regula la concentración de oxígeno disuelto en el agua, disminuyendo ésta según aumenta la temperatura. En su conjunto, los cambios que induce el cambio climático sobre los distintos procesos fluviales y la calidad del agua condicionan la permanencia de las comunidades bentónicas fluviales, que los habitan, e introducen cambios en su estructura y dinámica (BRITAIN 2008).

Los efectos del cambio climático pueden verse reforzados en los ecosistemas de alta montaña por la acción humana, como, por ejemplo, los

cambios de uso del suelo y la gestión hidráulica de los cauces. Dentro de las cuencas del PN-Aigüestortes, el efecto antrópico consiste principalmente en la regulación de algunos de los lagos de cabecera y la derivación de la mayor parte del caudal desde los cauces fluviales hasta plantas de generación hidroeléctrica que se encuentran en la parte baja de las cuencas o en cuencas próximas (CATALAN & VILALTA 1997). Este tipo de gestión implica caudales mínimos a lo largo de todo el año, sin la mayor parte de las oscilaciones propias del régimen hídrico pirenaico, con temperaturas más altas en verano (CATALAN & VILALTA 1997). Estos factores afectan la estructura de las comunidades fluviales, favorecen la colonización por especies menos estenotermas y reducen la capacidad de respuesta de las comunidades (resistencia y resiliencia) ante fenómenos extraordinarios (BRITAIN 2008), como las grandes riadas que exceden la capacidad de las canalizaciones de las obras de trasvase existentes.

El objetivo global de este proyecto es abordar la fragilidad de las comunidades bentónicas fluviales en sistemas de alta montaña ante los posibles escenarios que puede generar el Cambio Global en estos ecosistemas. Especialmente, aquellos asociados con la ampliación de los períodos y magnitud de las sequías, con el aumento de la temperatura o con la reducción de la concentración de oxígeno disuelto en el medio fluvial. Para alcanzar este objetivo global se han seleccionado las especies de plecópteros y efemerópteros, por la condición de ambos órdenes como buenos indicadores de la calidad ecológica de los ecosistemas fluviales y por el elevado número de especies estenotermas frías que tienen los plecópteros (FOCHETTI & TIerno de FIGUEROA 2008). También se ha seleccionado este último orden de insectos por haberse detectado recientemente en ellos la presencia de hemocianina, macromolécula que pertenece al grupo de las proteínas respiratorias en otros órdenes de animales (BURMESTER 2004; FOCHETTI *et al.* 2006). Finalmente, se han definido una serie de objetivos concretos que permiten abordar este estudio desde diferentes perspectivas:

- Composición faunística y variación de las distribuciones altitudinales de especies emblemáticas y características de ambos órdenes.
- Detección de hemocianina en las especies de plecópteros fluviales del PN-Aigüestortes.
- Comprobación del papel como proteína respiratoria de la hemocianina.
- Estudio del aislamiento de especies de plecópteros en el PN-Aigüestortes.
- Estudio del aislamiento de las poblaciones de efemerópteros de las especies de los géneros *Alainites* y *Acentrella* presentes en el PN-Aigüestortes.
- Estudio de la resistencia a la desecación del huevo en distintas especies de efemerópteros y plecópteros fluviales, centrándose especialmente en las especies más sensibles frente al cambio climático.
- Estudio de la amplitud actual de la dieta como descriptor para predecir la respuesta ante los cambios de disponibilidad de recursos en el ecosistema fluvial.
- Selección de descriptores y protocolos de conservación ante el cambio global.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Área de estudio y campañas de muestreo

Se han realizado muestreos durante los tres años de duración del proyecto (2008-2010), en 7 cuencas que drenan el PN-Aigüestortes. Los dos primeros años se realizaron campañas de muestreo entre finales de junio y principios de julio, mientras que en 2010 se muestreó solamente la primera semana de septiembre. Se ha muestreado un total de 32 tramos fluviales de 50 m de longitud: 10 en la cuenca del río Escrita; 2 en la del río Peguera; 15 en la cuenca del río Sant Nicolau; y 4 puntos más, repartidos entre los ríos Noguera de Tor, Aiguamòg, Valarties y Bonaigua (Tabla 1). Completados por tramos más amplios para la

«Estrategias de supervivencia ante el cambio global»

captura de adultos aéreos (100 m). Algunos puntos de especial interés faunístico se han visitado 2 o 3 años. Además, dentro de los 32 puntos, se incluyen 4 del río Sant Nicolau que se muestrearon en tres épocas del año (verano-otoño-primavera) entre 2008 y 2009, dentro del programa de seguimiento del LOOP (Long-term Observatory of Pyrenees).

Para la captura de las ninfas acuáticas se han realizado muestreos semicuantitativos utilizando una manga pentagonal con una red de 250  $\mu\text{m}$  de luz de malla. En cambio, para los adultos se han realizado muestreos cualitativos mediante una manga triangular estándar de la marca EFE&GB Nets para insectos aéreos de 500  $\mu\text{m}$  de luz de malla.

Los ejemplares capturados se fijaron en etanol al 100% y RNA-later para estudios moleculares, en etanol al 70% para estudios sistemáticos y morfológicos de todas las fases de desarrollo incluidos los huevos, y en nitrógeno líquido para estudios de proteínas y composición de isótopos estables. Finalmente, se capturaron ejemplares que se mantuvieron vivos para su traslado al laboratorio con el objetivo de cerrar los ciclos biológicos para confirmaciones taxonómicas y para estudios fisiológicos (respirometrías).

Independientemente de las capturas en el PN-Aigüestortes, la puesta a punto de las metodologías para la realización de las respirometrías y el estudio de la activación de la síntesis de la hemocianina en plecópteros se realizaron con ejemplares, procedentes del río Tordera en el parque natural del Montseny, de especies que son comunes en ambos macizos montañosos.

### Biodiversidad y distribución altitudinal de efemerópteros y plecópteros presentes en el PN-Aigüestortes

La identificación de la totalidad de larvas y adultos capturados en los distintos muestreos realizados, se ha llevado a cabo mediante el uso de claves y descripciones faunísticas disponibles para España (PUIG 1984; TIERNO DE FIGUEROA *et al.* 2003), Pirineos (VINÇON & RAVIZZA 2001) o Francia (THOMAS & GAZAGNES 1983). Cuando

PUNTO	SUBCUENCA	ALTITUD	COORDENADAS UTM	
LOOP-4	Sant Nicolau	2020	E 332112.00	N 4715634
16	Sant Nicolau	1914	E 330759.83	N 4715506.9
17	Sant Nicolau	1893	E 330294.83	N 4714965.9
LOOP-3	Sant Nicolau	1891	E 329630.00	N 4713673
13	Sant Nicolau	1863	E 329926.33	N 4714438.9
14	Sant Nicolau	1839	E 329480.83	N 4713581.9
12	Sant Nicolau	1834	E 329228.83	N 4713373.9
1	Sant Nicolau	1832	E 328994.83	N 4713225.9
11	Sant Nicolau	1833	E 329058.83	N 4713291.9
LOOP-2	Sant Nicolau	1760	E 328613	N 4713184
2	Sant Nicolau	1759	E 328370.83	N 4713223.9
18	Sant Nicolau	1629	E 327110.83	N 4713303.9
19	Sant Nicolau	1621	E 327098.83	N 4713273.9
20	Sant Nicolau	1619	E 326940.83	N 4713203.9
LOOP-1	Sant Nicolau	1380	E 323317	N 4712693
3	Noguera deTor	1570	E 323615.33	N 4716094.9
6	Peguera	2295	E 339699.83	N 4712708.9
7	Peguera	2029	E 340777.83	N 4713358.9
23	Escrita	2192	E 334746.33	N 4717867.9
24	Escrita	2187	E 334890.33	N 4717835.9
25	Escrita	2152	E 335184.33	N 4717403.9
26	Escrita	2154	E 335074.33	N 4717369.9
27	Escrita	2119	E 335724.33	N 4717223.9
8	Escrita	1809	E 337364.33	N 4716416.9
29	Escrita	1932	E 336561.83	N 4716642.4
30	Escrita	1921	E 336066.83	N 4716762.4
31	Escrita	1895	E 336722.33	N 4716140.9
10	Escrita	1690	E 338820.33	N 4716474.9
4	Vallarties	1400	E 325473.83	N 4725096.4
5	Aiguamog	1760	E 330253.83	N 4724671.4
22	Bonaigua	1800	E 336658.83	N 4723981.4

Tabla 1. Altitudes y coordenadas UTM de los puntos de muestreo en el PN-Aigüestortes.

Table 1. Geographical location (UTM) and altitude (m a.s.l.) of sampling points studied at the Aigüestortes National Park.

no se conocen las descripciones larvarias, se ha procedido a asignar morfotipos de acuerdo con la metodología estándar, a la espera de su cría en laboratorio para la obtención de machos adultos, con el fin de que el estudio genético y/o el estudio de la morfología externa de los huevos permitan confirmar de qué especies se trata.

Los datos obtenidos sobre los rangos altitudinales de las especies identificadas, han permitido el análisis de los cambios en la distribución de parte de las especies de ambos órdenes en función de la variación de distintos descriptores del cambio climático y global, temperatura y caudal fundamentalmente. Para comprender con mayor amplitud estos cambios, las comparaciones se han establecido tanto dentro del PN-Aigüestortes, gracias a un estudio previo realizado en 1994

(VENTURA 1998), como entre subcuencas próximas pertenecientes también al río Segre (PUIG 1980; YOUNES 2004).

#### Estudio molecular para la detección de hemocianina en especies de plecópteros del PN-Aigüestortes

La existencia de transcripción de hemocianina se ha estudiado en 14 especies de Plecópteros presentes en el PN-Aigüestortes, a partir de la detección de una secuencia de 580pb de mRNA que transcribe las dos subunidades de dicha proteína. La metodología completa puede consultarse en AMORE *et al.* (2009). Para lo cual se han analizado entre 3 y 5 individuos, de una o varias poblaciones presentes en los puntos de muestreo de este proyecto.



Además se ha estudiado la presencia real de esta proteína en dos especies de Perlidae (*Perla marginata* y *Dinocras cephalotes*) en las que se ha observado transcripción de la secuencia estudiada de mRNA y en otras dos sin transcripción (*Iso-perla viridineruis* y *Siphonoperla torrentium*), analizándose la presencia de las dos subunidades de hemocianina y de un grupo de proteínas próximas a ella (hexamerinas) que también se ponen de manifiesto con los mismos cebadores moleculares (primers). El análisis se ha realizado mediante técnicas de proteómica, gracias al uso de un espectrómetro de masas (nano-RP-HPLC-ESI-MS) en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Tuscia en Viterbo (AMORE *et al.* 2011).

#### **Activación de la producción de hemocianina ante la reducción de la concentración de oxígeno disuelto en el agua**

El estudio de la producción de hemocianina inducida por un déficit de oxígeno disuelto se ha realizado en larvas de plecóptero. Los ensayos se han realizado a  $16\pm 0,5^{\circ}$  C de temperatura ambiente controlada, mediante el uso de oxímetros para respirometrías Strathkelvin Inst. (modelo 782) de doble entrada, en cámaras cerradas de 750cc de capacidad. El ensayo se ha prolongado hasta que el consumo de oxígeno por parte de los individuos presentes dentro de las cámaras provocaba la reducción de la concentración de  $O_2$  a valores de 5, 2,6 y 0,0 mg/L de oxígeno disuelto en el agua. Todos los ensayos se han realizado para un total de entre 5 a 7 individuos por concentración. Los ensayos se han llevado a cabo con individuos de las especies *Perla marginata*, *Siphonoperla torrentium* y *Leuctra aurita*. También se han realizado con dos especies de efemerópteros (*Ecdyonurus* sp. y *Epeorus* sp.), con el objetivo de ver si este orden también posee algún tipo de hemocianina y es capaz de activar su producción ante un déficit del oxígeno disuelto. Se ha empleado la metodología de qRT-PCR para cuantificar la producción de hemocianina, utilizando como patrones-controles la transcripción de Actina y 18S para estimar el número real de réplicas de mRNA de hemocianina presente en cada individuo en cada uno de los grupos de ensayos realizados. En todos los casos se han empleado

frecuencias de 100 pb. Se han incluido como individuos de referencia, 5 ejemplares fijados inmediatamente después de su captura en el río, cuyos datos nos dan el número habitual de réplicas en condiciones naturales.

La temperatura utilizada en los ensayos es entre 4 y 6° C superior a la media estival registrada en condiciones naturales en aguas del río Sant Nicolau, por imperativos estructurales. Pero, al mismo tiempo, nos ofrece una aproximación a situaciones posibles futuras que ya se registran actualmente en alguno de los tramos inferiores regulados en los cauces principales del PN-Aigüestortes y del preparque.

#### **Estudio de la caracterización genética de especies y aislamiento de las poblaciones en especies de efemerópteros**

Inicialmente, en la solicitud del proyecto se propuso el estudio del aislamiento de las poblaciones de especies de los géneros *Alainites* y *Acentrella* (Ephemeroptera: Baetidae), partiendo de la información facilitada por otro grupo investigador procedente de un muestreo realizado en el PN-Aigüestortes durante el verano de 2005. Según dicha información *Acentrella* tenía poblaciones que habitaban en los tramos medios del río Sant Nicolau. Se escogió este género por que la estructura del corión de su huevo hace que las puestas sean poco tolerantes a los cambios de temperatura, al déficit de oxígeno y a la desecación de sus puestas por reducción del nivel de inundación del cauce (UBERO-PASCAL 2004). *Alainites* en contrapartida es un género circunmediterráneo, propio de cabeceras de montaña mediterránea y montaña media, que soporta mejor temperaturas superiores y con huevos que pueden ser resistentes a la desecación. Sin embargo, en nuestros muestreos no se han capturado individuos de *Acentrella* en ninguna estación del PN-Aigüestortes. La revisión por nuestra parte de los ejemplares asignados a este género en el muestreo de 2005, nos ha permitido comprobar que se trata de una identificación errónea. Por ello, junto con la amplia distribución en todas las cuencas del PN-Aigüestortes de *Alainites*, que elimina la posibilidad del aislamiento

de sus poblaciones, nos ha llevado a seleccionar para este apartado a especies del género *Rhithrogena*, todas ellas estenotermas frías y reófilas estrictas. En concreto del morfotipo dominante de *R. diaphana* y del morfotipo de *Rhithrogena loyola*, especie habitualmente distribuida a mayor altitud.

La caracterización genética de las especies la ha llevando a cabo Laurent Vuataz en el Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología de Lausanne (Suiza), dentro de los trabajos de investigación de su Tesis Doctoral. Se han enviado ejemplares de 5 poblaciones del morfotipo *R. diaphana* y de 1 población del morfotipo de *R. loyola* del PN-Aigüestortes, más 1 población adicional de referencia de la cabecera del río Ter perteneciente también la morfotipo de *R. diaphana*. Para la caracterización genética de las especies se ha utilizado un fragmento del gen COI (citocromo-oxidasa1) mitocondrial. Los marcadores moleculares para el estudio del aislamiento de poblaciones todavía no están completamente decididos, actualmente se está trabajando con distintos fragmentos del ADN mitocondrial, fragmentos de COI y la subunidad 16S, y microsatélites.

#### **Estudio de la caracterización genética de especies y aislamiento de poblaciones en especies de plecópteros**

La caracterización molecular del género *Pachyleuctra*, endémico de Pirineos, y de 2 especies de la familia Leuctridae y 2 especies de la familia Perlodidae se ha llevado a cabo mediante el uso de un fragmento de 300 pb de la subunidad 18S del ADN mitocondrial. En el estudio del aislamiento de las poblaciones que se lleva a cabo en los laboratorios de biología molecular del CEAB y de la Universidad de Tuscia en Viterbo, se está utilizando DNA mitocondrial, en concreto un fragmento de 344pb de la subunidad 12S y dos fragmentos de COI, de 596pb y 1300pb respectivamente.

El estudio del aislamiento de las poblaciones de la especie relicta *Arcynopteryx compacta*, se ha realizado mediante el uso de microsatélites por parte de Kathrin Theissingen en la Universidad de

Mainz, dentro de un estudio que se realiza a escala europea sobre el aislamiento biogeográfico de esta especie. La metodología utilizada puede consultarse en THEISSINGER *et al.* 2009. Por nuestra parte se han enviado a esta investigadora material procedente de 2 dos poblaciones de *A. compacta* para su inclusión en dicho estudio.

#### **Estudio de la estructura del huevo en especies emblemáticas de ambos ordenes de insectos**

Se ha analizado mediante distintas técnicas microscópicas, especialmente SEM, la ultraestructura de las capas coriónicas del huevo en distintas especies de ambos órdenes, que han incluido tanto especies comunes como endemismos y especies raras. Con especial atención en su capacidad para resistir la desecación. La metodología empleada en detalle puede consultarse en UBERO-PASCAL *et al.* 2005.

También se han observado «*in situ*» las zonas, substratos y modos de realizar las puestas, que pueden permitir establecer *a priori* qué especies pueden verse afectadas en mayor medida por las variaciones de sus hábitats introducidas por el cambio climático, a nivel de cambios hidráulicos.

#### **Estudio de la dieta en especies de plecópteros y efemerópteros**

Se ha analizado el contenido de los digestivos de especies comunes y emblemáticas, procedentes de poblaciones de las distintas subcuencas estudiadas, con el objetivo de identificar sus alimentos o presas preferentes, así como el rango de recurso que utilizan. Se está en proceso de analizar la variabilidad estacional de las dietas para 14 especies que cubren las distintas estrategias y tipos tróficos, como son: *Perla grandis*, *Perla marginata* y *Dinocras cephalotes* (macro depredadores); *Siphonoperla torrentium* e *Isoperla acicularis* (micro depredadores); *Protonemura beatensis*, *Protonemura pyrenaica* y *Amphinemura sulcicollis* (fragmentadora de materia particulada gruesa); *Baetis alpinus*, *Baetis nicolae* y *Rhithrogena cf diaphana* (fitófagas); *Habroleptoides confusa* y *Pachyleuctra benllochii* (detritívoros); *Serratella ignita* (omnívoro).

También se han enviado para su análisis muestras de poblaciones de 12 especies, con el objetivo de valorar globalmente su dieta mediante el uso de isótopos estables de carbono y nitrógeno. Para cada especie y población, se han encapsulado 2 mg de material, previamente desecado en estufa a 80° C y triturado, en cápsulas de estaño que se han plegado y cerrado, para posteriormente ser guardadas en gradillas de 96 pocillos y enviadas al Servicio de análisis de isótopos estables (SIF) de la Universidad de Davis (USA).

### Selección de especies indicadoras y propuestas de conservación

Se ha procedido a seleccionar especies y métricas indicadoras para el control de la evolución de las comunidades fluviales ante el Cambio Climático y Global. También se ha valorado la importancia y velocidad de los cambios históricos registrados con el objetivo de realizar una primera aproximación que permita la predicción de respuestas futuras según distintos escenarios de cambio. Finalmente, se hacen propuestas para la conservación de la biodiversidad de ambos órdenes y de las comunidades de macroinvertebrados fluviales en su conjunto.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Biodiversidad de efemerópteros y plecópteros en el PN-Aigüestortes

Aunque se partía de un estudio general sobre los macroinvertebrados que habitan en la red fluvial del Parque, realizado durante el verano de 1994 por VENTURA (1998), a la vista del listado de especies de ambos órdenes incluidos en el trabajo y de la ausencia de capturas de adultos, se esperaba que se incrementase el número de especies presentes. Este supuesto se ha visto ampliamente refrendado con un total de 85 especies identificadas hasta el momento de 50 plecópteros (Tabla 2) y 35 efemerópteros (Tabla 3), frente a los 13 y 12 taxones previamente citados respectivamente para cada orden por VENTURA (1998). Dentro de los plecópteros se han capturado 2 especies relictas (*Acynopteryx compacta* y *Taeniopteryx hubaulti*), 1 género endémico pirenaico (*Pachyleuctra*), 9 especies y 3 subespecies endémicas pirenaicas (*Pachyleuctra benllochi*, *Pachyleuctra bertrandi*, *Isoperla moselyi*, *Isoperla viridinervis*, *Nemoura linguata*, *Protonemura tuberculata*, *Protonemura vandeli*, *Leuctra kempnyi*, *Leuctra alosi*, *Isoperla acicularis acicularis*, *Protonemura intricata intricata*,

F. Perlodidae	F. Taeniopterygidae	F. Capniidae
<i>Acynopteryx compacta</i>	<i>Taeniopteryx hubaulti</i>	<i>Capnia nigra</i>
<i>Perlodes intricatus</i>	Nemouridae	<i>Capnia vidua</i>
<i>Perlodes cf microcephalus</i>	<i>Amphinemura standfussi</i>	<i>Capnioneura sp.</i>
<i>Isoperla acicularis acicularis</i> **	<i>Amphinemura sulcicollis</i>	F. Leuctrida
<i>Isoperla grammatica</i>	<i>Amphinemura triangularis</i>	<i>Pachyleuctra benllochi</i> **
<i>Isoperla cf moselyi</i> **	<i>Nemoura cinerea</i>	<i>Pachyleuctra bertrandi</i> **
<i>Isoperla viridinervis</i> **	<i>Nemoura linguata</i> **	<i>Leuctra alosi</i> *
<i>Isoperla sp2</i>	<i>Nemoura cf mortoni</i>	<i>Leuctra aurita</i>
F. Perlidae	<i>Nemoura uncinata</i>	<i>Leuctra despaxi</i>
<i>Perla grandis</i>	<i>Nemourella picteti</i>	<i>Leuctra hippopus</i>
<i>Perla marginata</i>	<i>Protonemura beatensis</i>	<i>Leuctra illiesi</i> *
<i>Dinocras cephalotes</i>	<i>Protonemura intricata intricata</i> **	<i>Leuctra inermis</i>
<i>Dinocras sp2</i>	<i>Protonemura meyeri</i>	<i>Leuctra kempnyi</i> **
F. Chloroperlidae	<i>Protonemura pyrenaica pyrenaica</i> **	<i>Leuctra cf lamellosa</i> *
<i>Siphonoperla cf montana</i>	<i>Protonemura risi spinulosa</i>	<i>Leuctra leptogaster</i>
<i>Siphonoperla torrentium</i>	<i>Protonemura tuberculata</i> **	<i>Leuctra cf major</i>
<i>Chloroperla tripunctata</i>	<i>Protonemura vandeli</i> **	<i>Leuctra rauscheri</i>
<i>Xantoperla apicalis</i>	<i>Protonemura sp1</i>	<i>Leuctra sp2</i>

**Tabla 2.** Lista de especies de adultos y larvas de plecópteros capturados en el PN-Aigüestortes. (\* endemismo ibérico; \*\* endemismo pirenaico).

**Table 2.** Species list of stonefly adults and nymphs captured at the Aigüestortes National Park. (\* Iberian endemism; \*\* Pyrenean endemism).



	F. Heptageniidae		F. Baetidae
<i>Epeorus assimilis</i>	<i>Rhithrogena diaphana</i>		<i>Alainites muticus</i>
<i>Epeorus sylvicola</i>	<i>Rhithrogena cf picteti</i>		<i>Baetis alpinus</i>
<i>Epeorus torrentium</i>	<i>Rhithrogena cf germanica</i>		<i>Baetis catharus</i>
<i>Ecdyonurus angelieri</i>	<i>Rhithrogena cf puytoraci</i>		<i>Baetis gadeai</i>
<i>Ecdyonurus cf. aurantiacus</i>	<i>Rhithrogena loyolaea</i>		<i>Baetis gr. lutheri</i>
<i>Ecdyonurus dispar</i>	<i>Rhithrogena mf semicolorata</i>		<i>Baetis nicolae</i> **
<i>Ecdyonurus forcypula</i>	<i>Rhithrogena sp1 (gr semicolorata)</i>		<i>Baetis melanonyx</i>
<i>Ecdyonurus mf helveticus</i>	<i>Electrogena lateralis</i>		<i>Baetis rhodani</i>
<i>Ecdyonurus cf macani</i>			<i>Baetis scambus</i>
	F. Leptophlebiidae		<i>Baetis sp3</i>
F. Ephemerellidae	<i>Habroleptooides berthelemyi</i>		<i>Cloeon schoenemundi</i>
<i>Serratella ignita</i>	<i>Habroleptooides confusa</i>		
	<i>Habroleptooides mf umbratilis</i>		F. Siphonuridae
F. Caenidae	<i>Paraleptophlebia cincta</i>		<i>Siphonurus lacustris</i>
<i>Caenis cf beskidensis</i>	<i>Leptophlebiidae sp1</i>		

**Tabla 3.** Lista de especies de adultos y larvas de efemerópteros capturados en el PN-Aigüestortes. (\*\* endemismo pirenaico).

**Table 3.** Species list of mayfly adults and nymphs captured at the Aigüestortes National Park. (\*\* Pyrenean endemism).

*Protonemura pyrenaica pyrenaica*) y finalmente 2 endemismos ibéricos (*Leucta illiesi* y *L. lamellosa*).

Merece la pena destacar la captura de ejemplares adultos micrópteros de la especie *Isoperla acicularis acicularis* en la población de un pequeño cauce de la cuenca del río Escrita a una altitud de 1809 m, con vuelo y capacidad de dispersión limitada; situación que se desconocía hasta el presente estudio. La tendencia al micropterismo es muy rara entre las especies europeas de *Isoperla*, ya que sólo se había observado en unas pocas poblaciones de *Isoperla viridinervis* en altitudes superiores a los 2.200 m para la vertiente norte pirenaica francesa, justo en el límite superior de su distribución (DESPAX, 1936). Este tipo de estrategia es utilizada por las especies de plecópteros que desarrollan la fase acuática de su ciclo vital en áreas restringidas o en los límites de su área de distribución, ya que el micropterismo o el braquipterismo trata de evitar la dispersión de los adultos aéreos hacia hábitats menos óptimos (BERTHÉLEMY, 1966; PUIG *et al.* 1990).

Dentro de los efemerópteros se ha capturado una de las pocas especies endémicas pirenaicas que existen, *Baetis nicolae*. Merece la pena destacar que varias especies de efemerópteros de las familias Heptageniidae y Leptophlebiidae, a partir de las larvas acuáticas, se han identificado a nivel de morfotipo únicamente (morfoespecies) ya que

su asignación a especies conocidas o a nuevas especies está pendiente de la captura de adultos, de la caracterización molecular de las poblaciones estudiadas o de descripciones de poblaciones pendientes de otras áreas peninsulares en las que se han capturado con anterioridad. También hay alguna identificación pendiente entre los ejemplares de plecópteros capturados, de modo que el número final de especies presentes en el PN-Aigüestortes se verá incrementado, pudiendo existir alguna especie nueva para la ciencia que deba describirse.

Al valorar biodiversidad presente en las dos cuencas principales del PN-Aigüestortes, cuencas de los ríos Escrita y Sant Nicolau, se observa que la riqueza de especies de plecópteros es muy alta en ambas cuencas, con 30 y 37 especies respectivamente. De hecho, el número de especies capturado en la cuenca del río Sant Nicolau supera con creces el valor máximo de 30 especies que se había obtenido en estudios previos de cuencas pirenaicas y que corresponde al conjunto de la red fluvial andorrana (PUIG, 1984). Los valores de biodiversidad de efemerópteros son inferiores a los de plecópteros para ambas cuencas, 28 especies en el río Sant Nicolau y 17 en el río Escrita, aunque en el caso de Sant Nicolau también es superior a las 22 especies capturadas en la red fluvial andorrana y en la cuenca pirenaica del río Ter (PUIG, 1984; PUIG *et al.* 1989), mientras

que el número relativamente bajo de especies capturadas en la cuenca del río Escrita, dado que el rango altitudinal es el mismo en ambas cuencas, puede deberse a que los cauces son más estrechos, encajados y sombreados, de modo que es esperable una menor producción primaria que limitaría a los efemerópteros que son fundamentalmente herbívoros (BRITAIN 2008).

El fichero con el listado de especies capturas en los muestreos de 2008 y 2009 se encuentra depositado en la base de datos de biodiversidad del PN-Aigüestortes (Departament de Medi Ambient, Generalitat de Catalunya). Actualmente, se está procediendo a la inclusión de todos los datos en la base de datos europea del GBIF dentro del proyecto BIODAT (EUI2008-03863), así como a su inclusión geo-referenciada en cartografía GIS dentro de un proyecto del LOOP (CGL2010-11510-E).

#### **Cambios en la distribución altitudinal de plecópteros y efemerópteros en el PN-Aigüestortes en los últimos 15 años**

Durante este período (1994-2009) se han observado cambios en las distribuciones altitudinales de casi todos los taxones identificados, ya sea a nivel de especie, como al nivel de grupo de especies, que es el nivel taxonómico utilizado por VENTURA (1998) para la mayor parte de los efemerópteros en su muestreo de 1994. Podemos agrupar las tendencias en tres tipologías distintas: especies estenotermas frías que han reducido su distribución al subir su límite altitudinal inferior, como por ejemplo *Baetis alpinus*, *Habroleptoides berthelemyi*, *Perla grandis* o *Arcynopteryx compacta*; especies más euritermas que han colonizado tramos superiores, la mayoría de los cuales no estaban presentes en el PN-Aigüestortes en el estudio de referencia de VENTURA (1998), como es el caso de *Perla marginata*, *Isoperla grammatica* o *Caenis cf beskidensis*; la tercera tipología corresponde a los taxones estenotermos fríos y reófilos estrictos que han reducido su distribución altitudinal al variar tanto su límite superior que ha bajado debido a la reducción del caudal en los tramos superiores, como su límite inferior que ha subido debido al efecto combinado del aumento de la temperatura y la reducción del caudal. El mejor ejemplo de esta

situación la encontramos en los grupos de especies de *Rhithrogena*, *R. gr loyolaea* y *R. gr semicolorata* (PUIG *et al.* 2010).

Si a estos cambios se añaden los observados en la red hidrográfica andorrana para el período 1978-2000, comparando los resultados de los trabajos de PUIG (1980 y 1984) y YOUNES (2004), son todavía más patentes los cambios y la velocidad de colonización desde cotas inferiores de algunas especies. Como ocurre con el efemeróptero *Alainites muticus* que ha pasado de estar ausente en la red fluvial andorrana a estar presente a lo largo de los ríos Gran Valira y Valira d'Orient, ocupando un rango altitudinal comprendido entre los 900 y los 2.100 m (PUIG *et al.* 2010).

En su conjunto estos cambios muestran cómo las especies estenotermas frías son desplazadas aguas arriba reduciendo sus rangos de distribución altitudinal, creemos que, en parte, directamente por el aumento de la temperatura y, en parte, por la competencia con especies más euritermas. Un claro ejemplo de esta situación la tenemos en el desplazamiento de *Perla grandis* por *Perla marginata* en el PN-Aigüestortes.

#### **Detección de hemocianina en las especies de plecópteros fluviales del PN-Aigüestortes**

El resultado del análisis de la presencia de hemocianina en 14 especies de plecópteros presentes en el PN-Aigüestortes, a partir de la detección de su transcripción (mRNA), ha confirmado que su presencia se encuentra restringida a algunas especies de macro y micropredadores pertenecientes a las familias Perlidae y Perlodidae (Tabla 4). Aparentemente, son pocas las especies que han retenido la capacidad de sintetizar esta proteína respiratoria según datos de AMORE & FOCHETTI (2009). Además es difícil de justificar porqué especies de una misma familia la han mantenido y otras no, aunque actualmente vivan en ecosistemas donde realmente sería una ventaja poseer esta proteína respiratoria, como son los ríos tropicales (AMORE *et al.* 2011). Finalmente, tratando globalmente todos los estudios que sobre transcripción de hemocianinas y hexamerinas han realizado los investigadores de este proyecto, se ha procedido a

SI	NO
<i>Perla grandis</i> <i>Perla marginata</i> <i>Dinocras cephalotes</i> <i>Arcynopteryx compacta</i> <i>Isoperla grammatica</i> <i>Isoperla acicularis acicularis</i>	<i>Pachyleuctra benllochi</i> <i>Leuctra alosi</i> <i>Isoperla viridinervis</i> <i>Perlodes intricatus</i> <i>Nemoura cinerea</i> <i>Protonemura tuberculata</i> <i>Amphinemura sulcicollis</i>

**Tabla 4.** Relación de especies en las que se ha detectado (SI) o no (NO) transcripción de hemociana.

**Table 4.** List of stonefly species with (SI) and without (NO) hemocyanin transcription detected.

realizar un estudio filogenético de la evolución de ambos grupos de proteínas en plecópteros (AMORE *et al.* en prensa).

Aunque se presupone que si la hemocianina no se transcribe el organismo no la produce, realmente es algo que no sabemos, al igual que no sabemos su vida útil en el organismo, o si puede regenerarse por lo que su transcripción no tiene porque ser constante. Por todo ello se ha procedido a comprobar mediante estudios de proteómica la presencia de la proteína en dos especies que la transcriben, *Perla marginata* y *Dinocras cephalotes*, y en otra dos que no lo hacen (*Isoperla viridinervis* y *Siphonoperla torrentium*). Los resultados obtenidos demuestran la presencia de hemocianina únicamente en las dos especies que la transcriben (AMORE *et al.* 2011), con lo que ya son tres, junto a *Perla grandis*, las especies en las que se constata directamente la presencia de esta proteína (FOCHETTI *et al.* 2006).

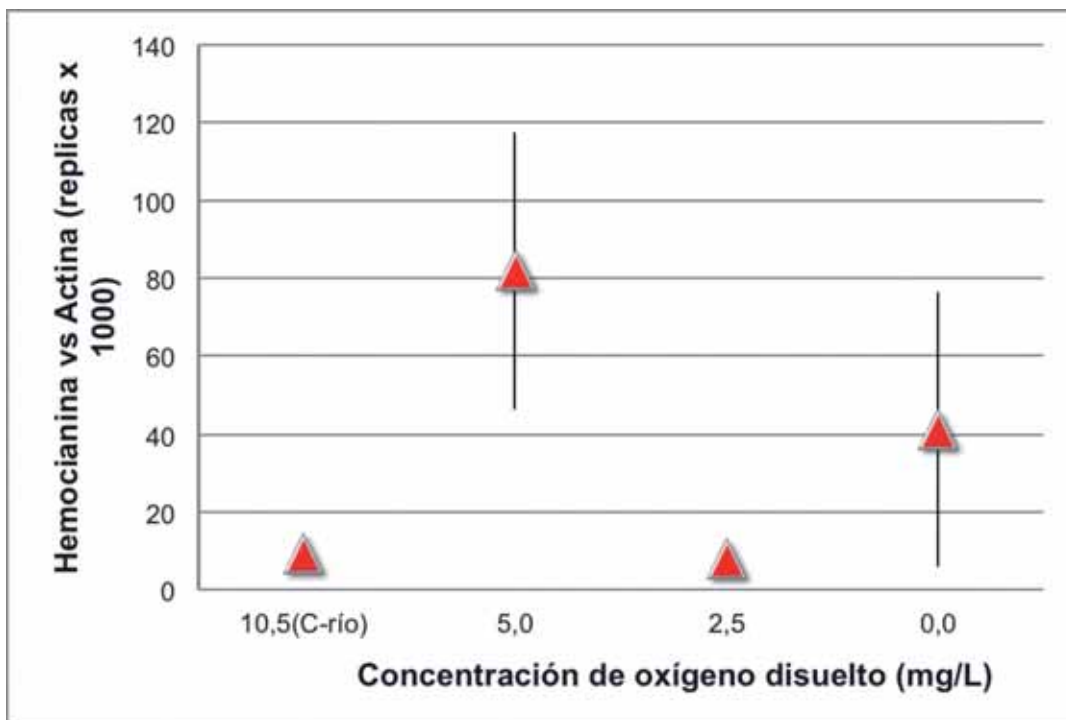
#### Activación de la producción de hemocianina ante la reducción de la concentración de oxígeno disuelto

Los ensayos se realizaron a  $16 \pm 0,5^\circ \text{C}$  de temperatura ambiente controlada durante todo el ensayo, equivalentes a ensayos realizados a una temperatura entre 4 y 6 grados superiores a las temperaturas medias mensuales registradas en el mes más cálido en los tramos habitados por las especies estudiadas, o a  $2-3^\circ \text{C}$  superiores a la media diaria máxima durante el mismo mes (LANDEIRA 2010). Se trataría por tanto de un escenario probable a mediados del presente siglo según las distintas predicciones existentes para las masas de agua del hemisferio norte (SCHNEIDER & HOOK 2010).

En los ensayos realizados con *Siphonoperla torrentium* y *Leuctra aurita* no se ha detectado ningún tipo de transcripción de hemocianina a pesar de que la concentración de oxígeno disuelto bajó hasta condiciones de anoxia durante los ensayos. De modo que para estas dos especies no se activa la producción de hemocianina como respuesta fisiológica al déficit de oxígeno, hecho que puede indicar la carencia o la inactivación permanente de los genes que codifican esta proteína respiratoria.

Sin embargo, los ejemplares de *Perla marginata* capturados en un cauce con una concentración natural  $10,5 \text{ mg/L}$  de oxígeno disuelto, que se utilizaron para los ensayos con una concentración de inicial del  $7,5 \text{ mg/L}$  de oxígeno disuelto en el agua de las cámaras del respirómetro, si han mostrado pautas de transcripción de hemocianina distintas en función de la concentración de oxígeno. Como puede verse en la Fig. 1, la transcripción (número de replicas) a  $5 \text{ mg/L}$  fue alta, decayendo cuando la concentración se reduce hasta  $2,4 \text{ mg/L}$ , y aumentando de nuevo al llegarse a condiciones de anoxia ( $0,0 \text{ mg/L}$ ). Esta respuesta debe interpretarse, teniendo en cuenta que las larvas de *Perla marginata* pueden presentar estados de inactividad-letargia próximos a la diapausa cuando las condiciones les son adversas, según se había comprobado previamente en otros estudios sobre la fisiología de esta especie (RÍOS 2000). De modo que a concentraciones medias de oxígeno la especie sigue transcribiendo la hemocianina, según aumenta el déficit entra en letargo, para posteriormente volver a transcribir hemocianina cuando las condiciones le impiden sobrevivir manteniendo el letargo.

Este ensayo demuestra por primera vez que la transcripción de hemocianina se activa en función



**Figura 1.** Promedios de replicas transcritas de hemocianina y desviación del promedio calculadas obtenidos a partir del análisis de qPCR de individuos de *Perla marginata* en experimentos de laboratorio con concentraciones de O.D. de 5, 2,5 y 0,0 mg<sup>-1</sup>L.

**Figure 1.** Average values of hemocyanin transcription by nymphs of *Perla marginata*, and average deviation from qPCR analysis of laboratory experiments at 5, 2.5 and 0.0 concentrations of D.O.

de los requerimientos fisiológicos de los plecópteros y que interviene en la captura y transporte del oxígeno por parte de las larvas acuáticas de estos. De este modo, la posesión de hemocianina se convierte en una ventaja ante los cambios de calidad del agua que implican el aumento de la temperatura y/o la reducción de concentración de oxígeno disuelto. O sea, una ventaja ante el cambio climático y el cambio global.

#### Caracterización molecular y estudio del aislamiento de poblaciones de plecópteros del PN-Aigüestortes

Se ha procedido a caracterizar el género endémico de Pirineos (*Pachyleuctra*) a partir de 2 poblaciones del PN-Aigüestortes mediante el uso de DNA mitocondrial, en concreto fragmentos de 12S, 18S y COI. También se ha caracterizado me-

dante los mismos marcadores moleculares los endemismos ibéricos *Leuctra alosi* e *Isoperla acicularis acicularis*, y la especie rara o poco frecuente *Leuctra despaxi*.

Al mismo tiempo se ha analizado el aislamiento de las poblaciones de *Pachyleuctra benllochii* presentes en las cuencas de los ríos Escrita y Sant Nicolau. Se ha comprobado que de los tres marcadores mitocondriales solo son efectivos el fragmento del 12S seleccionado y el fragmento corto del COI. Los datos obtenidos para los mismos marcadores aplicados a las otras dos especies de *Leuctra* analizadas, se están utilizando para ponderar las distancias moleculares relativas, junto con resultados existentes para especies y poblaciones del género *Tyrrhenoleuctra* (FOCHETTI *et al.* 2004; FOCHETTI & TIerno DE FIGUEROA 2009).

Así mismo se ha realizado una primera aproximación al estudio filogenético del género *Pachyleuctra* dentro de la Familia Leuctridae, mediante el uso del fragmento de 18S (Fig. 2). Como este gen es bastante conservativo en plecópteros, la agrupación jerárquica obtenida comparando especies de géneros de Leuctridae del hemisferio norte solo nos permite afirmar que se encuentra en una rama basal dentro de la subfamilia Leuctrinae, de modo que se trataría de un género relicto antiguo.

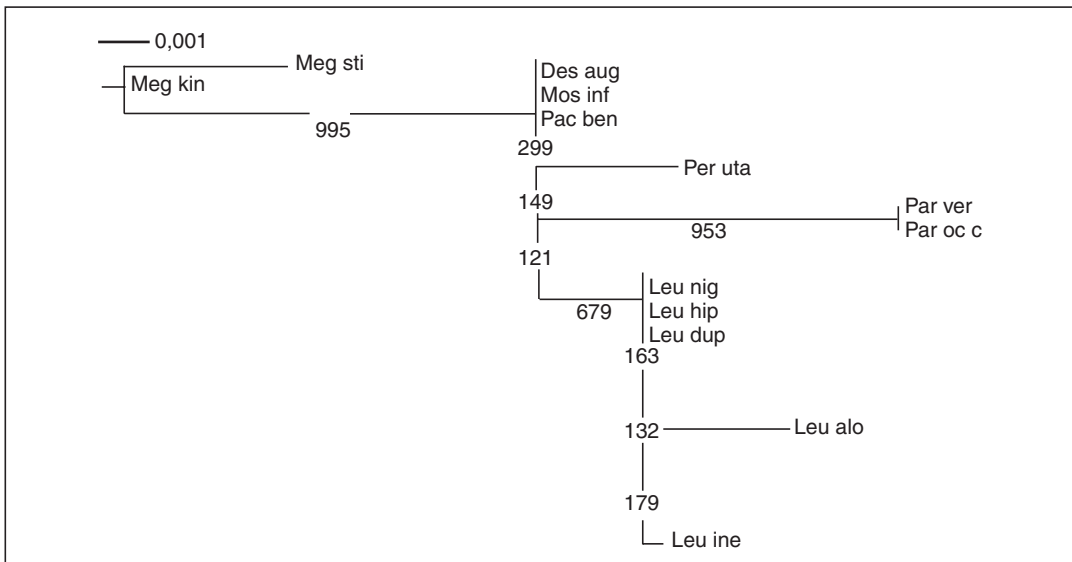
Los resultados obtenidos por Kathrin Theissinger (comunicación personal) para *Arcynopteryx compacta* indican que las poblaciones se encuentran aisladas cuando las distancias geográficas entre los tramos en que habitan son superiores a 1,5 km. De modo que las dos poblaciones existentes en las cuencas del río Escrita y del río Sant Nicolau están aisladas.

La captura de adultos micrópteros de *Isoperla acicularis acicularis* en el muestreo de septiembre de 2010, nos ha llevado a iniciar el estudio del aisla-

miento de esta población que se encuentra en la cuenca del río Escrita respecto a otras dos poblaciones presentes en la cuenca del río Sant Nicolau.

### Caracterización molecular y estudio del aislamiento de las poblaciones de efemerópteros del género *Rhithrogena* en el PN-Aigüestortes

Los resultados facilitados por Laurent Vautaz, han confirmado que las poblaciones del morfotipo de *R. loyolaea* presentes en el PN-Aigüestortes pertenecen verdaderamente a esta especie. Los individuos asignados al morfotipo de *R. semicolorata* es distinto de las especies del grupo *semicolorata* que ha analizado procedentes de los Alpes, pero no se puede confirmar la especie de que se trata por carecer de adultos que permitan inequívocamente asignar al nivel específico las poblaciones de este morfotipo del PN-Aigüestortes. En cambio, sí se ha confirmado que se trata de una especie ampliamente distribuida en Pirineos, ya que las poblaciones del PN-Aigües-



**Figura 2.** Cladograma de la familia Leuctridae basado en secuencias de 18S, mediante un análisis de «Maximum likelihood» (ML) con una construcción (consenso) del 50%. Las abreviaturas corresponden a las siguientes especies: Megaleuctra stigmata = Meg sti; Megaleuctra kincaidi = Meg kin; Despaxia augusta = Des aug; Moselia infuscata = Mos inf; Pachyleuctra benllochi (PNA) = Pac ben; Perlomyia utahensis = Per uta; Paraleuctra vershina = Par ver; Paraleuctra occidentalis = Par occ; Leuctra nigra = Leu nig; Leuctra hippopus = Leu hip; Leuctra duplicata = Leu dup; Leuctra alosi (PNA) = Leuctra alo; Leuctra inermis = Leu ine.

**Figura 2.** Cladogram of the family Leuctridae from ML analysis based on 18S sequences.



tortes, de la cabecera del río Ter y una población procedente del Pirineo francés, que también ha analizado, todas corresponden genéticamente a la misma especie.

Por ello se ha procedido a capturar ejemplares a punto de emerger en septiembre de 2010, que se han mantenido en el laboratorio hasta su fase de adulto aéreo. Actualmente se está realizando el pertinente estudio taxonómico completo de todas fases de desarrollo con el objetivo de determinar de qué especie se trata exactamente.

El estudio del aislamiento de las poblaciones de estas especies se encuentra actualmente en proceso, dentro de la investigación que Laurent Vautaz lleva a cabo para obtener el grado de Doctor. Según sus planes, los primeros resultados los conoceremos durante el primer semestre de 2011.

#### **Estudio de la resistencia a la desecación del huevo en distintas especies de efemerópteros y plecópteros**

Se ha estudiado la ultraestructura del corion de las siguientes especies de plecópteros: *Isoperla acicularis acicularis*, *Isoperla viridinervis*, *Amphinemura sulcicollis*, *Protonemura beatensis*, *Protonemura pyrenaica pyrenaica*, *Pachyleuctra benllochi*, *Leuctra alosi* y *Leuctra inermis*. En efemerópteros se han estudiado: 3 morfotipos de *Rhithrogena*, *Alainites muticus*, 3 especies de *Baetis* del grupo *alpinus*, *Habroleptoides berthelemyi*, *Habroleptoides confusa*, *Ecdyonurus* morfotipo *helvetius*, *Epeorus sylvicola* y *Epeorus* cf *assimilis*. También se ha observado la zona de puesta y el substrato donde se deposita la puesta para la mayor parte de estas especies. De momento se ha visto, que aquellas que fijan los huevos sobre substratos rígidos a poca profundidad tienen una estructura del corion compacta, sin cámaras aéreas ni aerópilos, que permitirían a las puestas resistir un cierto nivel de desecación, como sería el caso de las dos especies de *Habroleptoides* estudiadas y está en consonancia con el estudio de GAINO *et al.* (1993).

Las especies con los huevos menos adaptados a la desecación, como las especies del género *Rhith-*

*rogena*, tienen sistemas para anclarse a mayor profundidad y resistir velocidades de la corriente superiores si fuera el caso, de modo que solo sequías estivales extremas podrían afectarlas. Pero se ha detectado que el morfotipo dominante, *Rhithrogena* cf *diaphana*, tiene una emergencia no sincronizada de los adultos que se extiende entre julio y septiembre en el PN-Aigüestortes. La desincronización de la emergencia de los adultos se considera una ventaja en efemerópteros ante el cambio climático (BRITTAIN 2008).

Podemos afirmar a priori que no se han detectado especies que puedan verse gravemente afectadas por la desecación de sus puestas, entre las especies estudiadas, gracias a la combinación de estrategias de puesta y estructura coriónica de sus huevos.

#### **Estudio de la dieta en especies de plecópteros y efemerópteros**

Los resultados obtenidos hasta el momento, a la espera de analizar los resultados de la composición en isótopos estables, muestra la importancia de la vía detritiva en estos ecosistemas, gracias a la dieta detritívora de los recolectores (*Habroleptoides confusa*, *Pachyleuctra benllochi* y *Serratella ignita*) y al consumo de materia orgánica particulada gruesa y/o fina por parte de los fragmentadores (*Protonemura beatensis*, *Protonemura pyrenaica* y *Amphinemura sulcicollis*), junto con la dieta mixta fitodetrívora que presenta algún raspador (*Baetis nicolae*).

*Baetis alpinus* y *R. cf diaphana* son herbívoros estrictos según el análisis del contenido de los digestivos estudiados.

Entre los macro depredadores la amplitud del rango de presas que consumen, se encuentra directamente asociada tanto con la amplitud de su distribución altitudinal, como en evitar el solapamiento de dietas con otros depredadores, reduciéndose así la competencia efectiva entre ellos (WARD 1992). En el PN-Aigüestortes, esta pauta puede verse en la familia Perlidae, donde se observa que la especie más euriterma, *Perla marginata*, depreda sobre un mayor número de presas distintas que abarca desde quironómi-

dos hasta otros plecópteros de menor talla, especialmente de las familias Leuctridae y Nemouridae. Mientras que *Dinocras cephalotes*, en los tramos en los que cohabita con *Perla marginata*, basa su consumo en depredar poblaciones de especies que habitan en zonas con mayor corriente, especialmente de efemerópteros (Baetidae) y plecópteros (Nemouridae), y que no son las preferidas por *Perla marginata*. Sin embargo, *Dinocras cephalotes* en tramos aguas arriba, en los que cohabita con la especie estenoterma *Perla grandis*, amplía el rango de presas que consume. En estas zonas *Perla grandis* mantiene un rango similar de presas al mostrado por *Dinocras cephalotes* en los tramos inferiores. La compartimentación del uso de los recursos alimenticios entre especies depredadoras próximas ha sido documentada en sistemas fluviales por otros autores (PECKARSKY 1984; PECKARSKY & PENTON 1989). Si se comparan las dietas de los macro depredadores estudiados con las densidades de sus poblaciones, nos encontramos con un gradiente de abundancias que aumenta en función de la tolerancia térmica y de la amplitud de grupos de presas consumidas (*Perla marginata* > *Dinocras cephalotes* > *Perla grandis*).

Dentro de los micro depredadores se han estudiado solo larvas de tamaño grande. Los resultados observados para *Isoperla acicularis acicularis* indican que esta especie depreda principalmente sobre quironómidos y larvas de primeros estadios de Baetidae en los cauces del PN-Aigüestortes, coincidiendo con la dieta observada en poblaciones del Pirineo francés por BERTHELÉMY & LAHOUD (1981). Mientras que por el contrario *Siphonoperla torrentium* caza casi exclusivamente quironómidos.

Los resultados obtenidos en este proyecto apoyan la predicción dada por BRITTAIN (2008) de que especialmente los fitófagos estrictos y los depredadores con menor rango de presas son los grupos que pueden ser más sensibles y verse afectados en mayor medida por los cambios funcionales y de calidad que pueda inducir cambio climático en los ecosistemas fluviales.

### Selección de especies indicadoras, métricas y propuestas de conservación

El análisis que se ha realizado dentro de este proyecto de los cambios en las distribuciones altitudinales de varios taxones y especies indicadoras de calidad para los ecosistemas fluviales de alta montaña, a partir de datos pertenecientes al PN-Aigüestortes (VENTURA 1998 y este proyecto) y a cuencas pirenaicas próximas como la andorrana (PUIG 1984; YOUNES 2004), demuestra que períodos de entre 15 y 20 años son suficientes para permitir la colonización de toda una cuenca fluvial por parte de especies más euritermas procedentes de tramos inferiores y el desplazamiento aguas arriba de las especies más estenotermas con la consiguiente reducción de su distribución geográfica y el aislamiento de sus poblaciones. Es decir, que se han observado cambios altitudinales máximos de entre 600 y 1500 m en un período de tiempo muy corto, que se asocia con aumentos de la temperatura media anual del aire de 2,5° C y de 6° C en la temperatura media del aire durante la primavera (CATALAN *et al.* 2002).

La gran velocidad de respuesta observada de las especies de plecópteros y efemerópteros ratifica nuestra hipótesis de partida que consideraba a ambos ordenes de insectos como buenos indicadores del cambio climático y del cambio global. También va a condicionar y justifica la periodicidad del seguimiento de algunas de las métricas que se proponen, sí además se tienen en cuenta las predicciones hechas en 2010 por el Servicio Meteorológico de Cataluña, que prevé un incremento entre 4 y 6° C de la temperatura media anual del aire y una reducción en un 30% de las precipitaciones anuales en Pirineos para finales de este siglo.

Si las predicciones climáticas se cumple se esperan importantes cambios en la biodiversidad de plecópteros y efemerópteros, como la eliminación de las especies estrictamente estenotermas frías de plecópteros, que en el PN-Aigüestortes representan aproximadamente el 25% de las especies que lo habitan actualmente. También pueden llegar a desaparecer las especies más reófilas de efemerópteros y las estenotermas frías de este

orden. De modo que el escenario probable plantea «*a priori*» una importante pérdida de especies, que implicaría la desaparición/extinción de algunas de ellas.

A la hora de seleccionar métricas para el seguimiento de la evolución de las comunidades fluviales en el PN-Aigüestortes se han tenido en cuenta las características bioindicadoras de especies y taxones según varios criterios:

- Especies estenotermas frías indicadoras de Cambio Climático: *Isoperla acicularis acicularis*, *Perlodes intricatus*, *Perla grandis*, *Arcynopteryx compacta* y *Taeniopteryx hubaulti* (las 2 últimas serían de las primeras en extinguirse en los Pirineos y todas verían retroceder su límite altitudinal inferior).
- Especies más euritermas indicadoras de Cambio Climático: *Serratella ignita*, *Perla marginata* y las especies de *Caenis* (todas ellas podrían colonizar tramos superiores).
- Endemismos pirenaicos con distribuciones restringidas en la vertiente sur (España y Andorra): *Pachyleuctra bertrandi*, *Pachyleuctra benllochii* y *Protonemura vandeli* (todas ellas son especies para las que actualmente se conocen entre 2 y 6 localidades únicamente y que deberían considerarse en peligro para España).
- Especies indicadoras estenotermas frías y reófilas estrictas, indicadoras del aumento de la temperatura y de la reducción de caudales/precipitaciones (indicadoras de Cambio Global incluido el Cambio Climático): especies del género *Rhithrogena*. Algunas pueden desaparecer al tiempo que se describen para la ciencia, a menos que se realice una gestión de caudales acorde con criterios de conservación y no únicamente de explotación.
- La presencia de hemocianina como ventaja adaptativa ante el cambio global en especies de plecópteros.
- La amplitud de la dieta en plecópteros depreadores y la labilidad en el uso de recursos

«Estrategias de supervivencia ante el cambio global»

tróficos distintos por especies de ambos órdenes como ventajas adaptativas ante el cambio global.

Englobando todos los criterios, se propone las siguientes métricas y actuaciones:

- 1) Riqueza de plecópteros, valoración cada 5 años en las cuencas de los ríos Escrita y Sant Nicolau.
- 2) Densidades relativas de las especies de Perlidae, valoradas anualmente en 5 tramos de la cuenca del río Sant Nicolau que abarquen el rango altitudinal de sus cauces permanentes (1.400 y 2.300 m).
- 3) Distribución y estado de las poblaciones actuales de los dos grupos de especies de *Rhithrogena* que se conocen en el PN-Aigüestortes, comprobándose la incidencia de sus parásitos quironómidos en ellas. Seguimiento anual, sin extracción definitiva de los individuos que se capturen.
- 4) Seguimiento de las especies relictas *Arcynopteryx compacta* y *Taeniopteryx hubaulti* en riesgo de extinción en Pirineos, con periodicidad anual o bianual mediante capturas no extractivas definitivas.
- 5) Seguimientos anuales de poblaciones de especies emblemáticas, endemismos pirenaicos con distribuciones restringidas en la vertiente sur (España y Andorra): *Pachyleuctra benllochii*, *Pachyleuctra bertrandi* y *Protonemura vandeli*. Capturas no extractivas definitivas.

Las tres primeras métricas que se proponen pueden ser utilizadas en seguimientos para conocer y valorar el impacto del cambio climático y del cambio global en ecosistemas fluviales de alta montaña pertenecientes a otros Parques Nacionales.

Para permitir que las capturas y el seguimiento no diezmen las poblaciones de las especies que se proponen, los muestreos deben hacerse mediante captura y liberación de los ejemplares capturados (capturas no extractivas definitivas).

Para ello es preciso que los taxones seleccionados puedan identificarse «*in situ*». Con este objetivo se están elaborando actualmente fichas de especies que incluyen el material fotográfico necesario para permitir las identificaciones en el campo con una lupa de mano. También se están desarrollando protocolos sencillos para facilitar las capturas de las especies seleccionadas, que incluyen en qué hábitats muestrear, cómo muestrear y cuándo hacerlo, con el único objetivo de no arrasar los ecosistemas que deben controlarse.

Hay actuaciones necesarias tendentes a garantizar la conservación de la biodiversidad de plecópteros y efemerópteros en el PN-Aigüestortes que deberían considerarse. Como la especial preservación de algún cauce concreto que incluye buena parte de los endemismos y especies en riesgo, para el que deben establecerse medidas tendentes a limitar los posibles impactos que puedan producirse asociados a la gestión del PN-Aigüestortes. En concreto, se recomienda tener

en cuenta la protección del cauce del tercer barranco de PuiPlà, punto de muestreo 8 (Tabla 1). También se deberían aumentar los caudales de los tramos regulados, aproximándolos a los caudales de mantenimiento precisos para preservar el mayor tiempo posible las comunidades de macroinvertebrados propias de estos cauces, cerrando el paso a especies más euritermas de cauces con menor caudal.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se ha beneficiado de una Ayuda para la Investigación del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Organismo Autónomo Parques Nacionales (convocatoria 2007), y de una Ayuda del Programa CONSOLIDER-INGENIO del Ministerio de Educación y Ciencia (CSD2007-00067). Los autores quieren agradecer la ayuda prestada en los trabajos de campo y laboratorio a los investigadores del LOOP, al personal del PN-Aigüestortes y a Andrea Landeira.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORE, V., BELARDINELLI, M., GUERRA, L., BUONOCORE, F., FAUSTO, A.M., UBERO-PASCAL, N. & FOCHETTI, R. 2009. Do really all stonefly nymphs have respiratori proteins? Futher data on the presence of hemocyanin in the larval stage of Plecoptera species. *Insect Molecular Biology*, 18: 203-211.
- AMORE, V. & FOCHETTI, R. 2009. Present knowledge on the presence of hemocyanin in stoneflies (*Insecta: Plecoptera*). *Aquatic Insects* 31 Suppl 1: 577-584.
- AMORE, V., GAETTANI, B., PUIG, M.A. & FOCHETTI, R. (en prensa). New data on the presence of hemocyanin in the Plecoptera: recomposing a puzzle. *Journal of Insect Science*.
- AMORE, V., PUIG, M.A., TIMPERIO, A.M., EGIDI, G., UBERO-PASCAL, N. & FOCHETTI, R. 2011. Comparative Proteomic Analysis of Hemocyanins in *Dinocras cephalotes* and *Perla marginata* (Plecoptera). *Molecular Ecology and Evolution* 40: 167-171.
- BERTHELEMY, C. 1966. Recherches écologiques et biogéographiques sur les Pléoptères et Coléoptères d'eau courante (*Hydraena* et *Elminthidae*) des Pyrénées. *Annales de Limnologie* 2: 227-458.
- BERTHELEMY, C. & LAHOUD, M. 1981. Régimes alimentaires et pièces buccales de quelques Perlodidae et Perlidae des Pyrénées (Plecoptera). *Annales de Limnologie* 17: 1-24.
- BURMESTER, T. 2004. Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins. *Micron* 35: 121-122.
- BRITAIN, J.E. 2008. Mayflies, biodiversity and climate change. En: F.R. Hauer, J.A. Stanford & R.L. Newell (eds.) *International Advances in the Ecology, Zoogeography, and Systematics of Mayflies and Stoneflies*. pp. 1-14. University of California Press, Berkeley.
- CATALAN, J. & VILALTA, R. 1997. *L'Obra hidràulica en els Pirineus*. Editado por ENHER, Fundació LaCaixa y FECSA. 583 pp.
- CATALAN, J., PLA, S., RIERADEVALL, M., FELIP, M., VENTURA, M., BUCHACA, T., CAMARERO, L., BRANCELJ, A., APPLEBY, P.G., LAMI, A., GRYNES, J.A., AGUSTÍ-PANAREDA, A. & THOMP-

- SON, R. 2002. Lake Redó ecosystem response to an increasing warming in the Pyrenees during the twentieth century. *Journal of Paleolimnology* 28: 129-145.
- DESPAX, R. 1936. Contribution a l'étude du genre *Chloroperla* (Pictet) (*Isoperla* Banks). *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* 66: 337-398.
- FOCHETTI, R., BELARDINELLI, M., GUERRA, L., BUONOCORE, F., FAUSTO, A.M. & CAPORALE, C. 2006. Cloning and Structural Analysis of a Hemocyanin from the stonefly *Perla grandis*. *The Protein Journal* 25: 443-454.
- FOCHETTI, R., KETMAIER, V., OLIVERIO, M., TIERNO de FIGUEROA, J.M. & SEZZI, E. 2004. Biochemical Systematics, Biogeography and Evolutionary Rates in Species of the Mediterranean Genus *Tyrrhenoleuctra* (Plecoptera, Leuctridae). *Insect Systematics & Evolution* 35: 299-306.
- FOCHETTI, R. & TIERNO de FIGUEROA, J.M. 2008. Global diversity of stoneflies in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 365-377.
- FOCHETTI, R. & TIERNO de FIGUEROA, J.M. 2009. A new species of Leuctridae discovered by means of molecular and biochemical approaches: *Tyrrhenoleuctra antoninoi* n. sp. (Insecta: Plecoptera). *Zootaxa* 2112: 41-46.
- GAINO, E., MAZZINI, M. & SARTORI, M. 1993. Comparative analysis of the chorionic pattern in Habroleptoides species (Ephemeroptera, Leptophlebiidae). *Boll. Zoology*, 60: 155-162.
- LANDEIRA DABARCA, A. 2010. Variabilidad temporal de comunidades de Macroinvertebrados en el Parque Nacional de Aigüestortes. Tesis de Master. Universidad de Girona, Girona. 52 pp.
- PECKARSKY, B.L. 1984. Predator-prey interactions among aquatic insects. En: V.H. Resh & D.M. Rosenberg (eds.) *The Ecology of Aquatic Insects*. pp 196-254. Praeger Scientific Publishers, New York.
- PECKARSKY, B.L. & PENTON, M.A. 1989. Mechanisms of prey selection by stream-dwelling stoneflies. *Ecology* 70: 1203-1218.
- PUIG, M.A. 1980. Contribució a l'estudi de l'ecologia comparada dels Plecòpters i Efemeròpters d'Andorra. *Butlletí del Institut Català de Historia Natural* 45: 77-87.
- PUIG, M.A. 1984. Efemerópteros y Plecòpteros de los ríos catalanes. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 582 pp.
- PUIG, M.A., AMORE, V., UBERO-PASCAL, N. & FOCHETTI, R. 2010. Biodiversitat de Plecòpters i Efemeròpters al Parc Nacional d'Aigüestortes i Estany de Sant Maurici. En: Aniz M. (ed.) *Jornades sobre Recerca al Parc Nacional d'Aigüestortes i Estany de Sant Maurici (8es: 2009; Espot, Catalunya)*. pp 123-134. Publicacions Generalitat de Catalunya, Departament de Medi Ambient i Habitatge. Barcelona.
- PUIG, M.A., FERRERAS-ROMERO, M. & GARCIA-ROJAS, A.M. 1990. Morphological variability of *Tyrrhenoleuctra minuta* (Klapalek, 1903) in South-Spain. En: I.C. Campbell (ed.) *Mayflies and Stoneflies*. pp 357-360. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- PUIG, M.A., GONZÁLEX, G. & RECASENS, L. 1989. Modelos de distribución de Plecòpteros, Efemerópteros, Tricópteros y Simúliidos en el río Ter. *Limnética* 3: 125-132.
- RÍOS, H. 2000. Interacciones entre comunidades de cianobacterias epilíticas fluviales y poblaciones de efemerópteros y plecòpteros: Efectos de la toxicidad de las cianobacterias. Memoria Investigación DEA. Universidad de Girona. Girona. 78 pp.
- SCHNEIDER, P. & HOOK, S.J. 2010. Space observations of inland water bodies show rapid surface warming since 1985. *Geophysical Research Letters* 37: L22405.
- SERVEI METEREOLÒGIC DE CATALUNYA (SMC). 2010. Informe escenaris canvi climàtic, Juny 2010. 4 pp.
- THEISSINGER, K., FELDHEIM, K.A., SEITZ, A. & PAULS, S.U. 2009. Isolation and characterization of 11 polymorphic trinucleotide microsatellite markers in the stonefly *Arcynopteryx compacta* (Plecoptera: Perlodidae). *Molecular Ecology Resources* 9: 357-359.
- THOMAS, A.G.B. & GAZAGNES, G. 1983. Ephéméroptères du Sud-Ouest de la France. III. *Baetis nicolae* n. sp. des Pyrénées (Baetidae). *Bulletin Histoire Naturelle Toulouse* 119: 71-74.
- TIERNO de FIGUEROA, J.M., SANCHEZ-ORTEGA, A., MEMBIELA, P. & LUZÓN-ORTEGA, J.M. 2003. Plecoptera. En: M.A. Ramos *et al.* (eds.) *Fauna Ibérica*, vol. 22. 404 pp. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid.



- UBERO-PASCAL, N. 2004. Estudio morfológico del huevo en los órdenes Ephemeroptera y Plecoptera. Aplicación taxonómica en la cuenca del Río Segura (S.E. de la Península Ibérica). Universidad de Murcia, Murcia. 580 pp.
- UBERO-PASCAL, N., FORTUÑO, J.M. & PUIG, M.A. 2005. New application of air-dry techniques for studying Ephemeroptera and Plecoptera eggs by Scanning Electron Microscopy. *Microscopy Research and Technique* 68: 264-271.
- VENTURA, M. 1998. Distribució de les comunitats de macroinvertebrats als rius del Parc Nacional d'Aigüestortes i Estany de Sant Maurici (Pirineus Centrals). En : Aniz M. (ed.) IV Jornades sobre Recerca al Parc Nacional d'Aigüestortes i Estany de Sant Maurici. pp 163-178. Departament de Medi Ambient, Generalitat de Catalunya. Barcelona.
- VINÇON, G. & RAVIZZA, C. 2001. Leuctridae (Plecoptera) of the Pyrenees. *Annales de Limnologie* 37: 293-322.
- WARD, J.V. 1992. *Aquatic Insect Ecology: 1. Biology and Habitat*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 438 pp.
- YOUNES, Y. 2004. Responses des communautés benthiques et piscicoles des cours d'eau d'Andorre aux perturbations d'origine anthropique. Role des microhabitats et recherche d'outils de bioindication en milieu montagnard. Tesis Doctoral. Université Paul Sabatier, Toulouse III. 253 pp.

