UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

La evolución del viviparismo en *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758)

DAVID BUCKLEY IGLESIAS
Museo Nacional de Ciencias Naturales

TESIS DOCTORAL
Madrid, mayo 2003

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA
MUSEO NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES

LA EVOLUCIÓN DEL VIVIPARISMO EN *SALAMANDRA SALAMANDRA* (LINNAEUS, 1758)

Memoria presentada por DAVID BUCKLEY IGLESIAS para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

David Buckley Iglesias

Vº Bº Director de Tesis

Dra. Marina Alcobendas Bouche

Vº Bº Director de Tesis

Dr. Mario García-París

Vº Bº Tutora de Tesis

Dra. Pilar Herrero Solans

Madrid, mayo 2003

LA EVOLUCIÓN DEL VIVIPARISMO EN *SALAMANDRA SALAMANDRA* (LINNAEUS, 1758)

David Buckley Iglesias

Madrid, mayo 2003

A Pere Alberch,
de quien me hubiera gustado aprender más

A Marina y Mario,
por su ayuda y confianza durante todos estos años

ÍNDICE

Agradecimientos 9

I- Introducción 11
1. Novedades evolutivas 15
2. El viviparismo 17
Conceptos 17
El viviparismo en anfibios 18
3. La familia Salamandridae. *Salamandra salamandra*. Generalidades 19
4. Modos de reproducción en Salamandridae 23
5. Objetivos 25

II- El viviparismo en *Salamandra salamandra*: una aproximación filogeográfica 27
1. Introducción 29
2. Muestreos 31
3. Secuenciación de ADN 33
3.1 Metodología 34
Reconstrucción filogenética 37
Análisis filogeográfico 39
3.2 Resultados 41
Hipótesis filogenéticas 44
Análisis filogeográfico 48
4. Electroforesis de aloenzimas 55
4.1 Metodología 56
Aplicaciones y limitaciones de la técnica 56
Desarrollo de la técnica 57
Parámetros de variabilidad 58
Reconstrucción filogenética 60
4.2 Resultados 65
Hipótesis filogenéticas 67
5. Discusión 75
5.1 El viviparismo en Salamandridae 75
5.2 El viviparismo en *S. salamandra* 77
El paisaje fenotípico 78
El paisaje nuclear 78
El paisaje mitocondrial 79
5.3 Diferentes marcadores, diferentes paisajes evolutivos: análisis filogeográfico de las discordancias 79
Apéndices 87

III- Ontogenia y viviparismo 111
1. Introducción 113
¿Qué es una ontogenia? 113
El concepto de heterocronía 114
Heterocronías y anfibios 117
Una aproximación internalista al viviparismo en Salamandra salamandra 117
Dentición y balancines 118
2. Material y Métodos 120
3. Resultados 122
Desarrollo ovovivíparo 122
Desarrollo vivíparo 131
Dentición y balancines 136
4. Discusión 140
Secuencia de desarrollo en Salamandra salamandra 140
Comparación de las secuencias de desarrollo de las salamandras ovovivíparas y vivíparas 142
Variaciones en la ontogenia y evolución del viviparismo 146

IV- Metamorfosis y plasticidad fenotípica 153
1. Introducción 155
2. Material y Métodos 158
2.1 Diseño experimental 159
2.2 Datos analizados y su tratamiento 159
Análisis de la variación genética del crecimiento y de los rasgos metamórficos . . 160
3. Resultados 163
Efecto del tamaño de las larvas al nacer sobre la supervivencia, el crecimiento y la metamorfosis 163
Variación en las distintas familias del crecimiento larvario y de los rasgos metamórficos analizados 165
Plasticidad de los rasgos metamórficos en condiciones de variación de alimentación y temperatura 167
Tamaño de las madres y tamaño de los huevos 169
4. Discusión 171
Apéndice 179

V- En síntesis 185

VI- Conclusiones 193

VII- Bibliografía 197

AGRADECIMIENTOS

Tremendos personajes los que se han ido cruzado en mi camino y han conseguido que termine la innombrable. Un gusto ha sido poder contar con su ayuda y, aún más, con su cariño. Agradecido quedo a todas ellas/os. Ahí va un recordatorio de algunos agradecimientos:

Una primer agradecimiento muy especial requieren Marina Alcobendas y María José Blanco. Sin ellas, hubiese sido del todo imposible acabar (incluso empezar) todo este lío. Siempre me han ayudado y se han hecho "cargo de mí" en los momentos más delicados.

Otra mención especial merece el Dr. José Templado por haberse hecho cargo del proyecto de investigación y, por tanto, de nosotros después de la muerte del Prof. Pere Alberch. Sin su ayuda no hubiéramos podido proseguir las investigaciones que teníamos en curso. Muchas gracias, Templado, por toda tu ayuda.

A las Dras. Pilar Herrero y Begoña Arano, mis "madrinas científicas", les debo mucho más de lo que parece. Gracias por colarme en el Museo, iniciarme en esto de los anfibios y enseñarme cómo se trabaja bien y a gusto.

A Beatriz Arconada, María José Blanco, Mercedes París, Mario García-París y Marina Alcobendas por su ayuda en los muestreos. También tengo que agradecer la ayuda prestada por todos los organismos oficiales responsables, que nos han concedido los permisos de captura necesarios para llevar a cabo este estudio.

Muchas gracias a Lourdes y Toñi por toda su ayuda en el laboratorio, tanto para las electroforesis como para los trabajos de secuenciación. Como siempre, ha sido un placer trabajar con vosotras.

Las muestras del microscopio electrónico fueron preparadas bajo la tutela de Laura Tormo, recientemente incorporada al MNCN (gracias, Laura, por tu ayuda) y la del inigualable (en todos los aspectos) Josefo. Que sepas que se te echa de menos. Va por ti, maestro.

Gracias también a Miguel Tejedo por su participación en el Capítulo IV, instruyéndonos con los análisis estadísticos.

Nueva mención especial para Maria José Blanco, por todas su ayuda prestada a la hora de escribir el capítulo III. Su claridad de ideas y de explicaciones me han permitido disfrutar con el complicado mundo del desarrollo y de las heterocronías.

Con 'el grupo' herpetológico también he disfrutado y aprendido en los últimos tiempos. Entre discusiones, salidas de campo y congresos, todo se hace mucho más ameno. Y si encima le ayudan a uno con críticas y sugerencias, pues mejor que mejor. Gracias Íñigo (Martínez Solano), Marina (Alcobendas), Mario (García-París), Eva (Albert), Jesús (compañerodepisoManzanilla), Marisa (Esteban), Ernesto (Recuero) y Jaime (Bosch), además

de las recientes incorporaciones lusas (Helena y José). Mención especial requiere el gran jefe Mario, por toda su ayuda y enseñanzas. Siempre es un placer trabajar con él.

Un besazo fuerte para los últimos llegados al mundo de los Doctores del MNCN. Sé que os debo una cena por haber sido el último (o casi). Entre piques, apuestas, risas y, sobre todo, mucha ayuda, el exxtréeesss ha sido mucho más llevadero. Pilar, Felipe, Susana, Paco, Manolo, Lu…… enhorabuena a todas/os, Doctoras/es.

Más agradecimientos a los compañeros de Fiv-Center, mi otra vida de biólogo. Esos desayunos tan estupendos hacen más llevaderos los horribles madrugones. Laurita, Raquel, Gloria…… habrá que irse a cenar un día de estos.

A Silvia, al maestro Alcaide y a Marta, que también han tenido que aguantar, durante largos años, el estrés del que escribe. Nos esperan tiempos de celebraciones, id haciendo hueco en vuestras apretadas agendas.

Agradecido de corazón a todos los que me han ayuda en el Museo (y fuera de él) a dar el último (bueno, y el primero también) empujón a esta tesis, sobre todo a Beatriz Arconada, Pepe Fernández (qué habría hecho sin él…… bueno, yo y todos los demás), Felipe Morcillo, Annie Machordom y Mónica Buckley. Gracias de las buenas por todo vuestro apoyo y muy (pero que muy) especialmente a Beatriz, la sonrisa que nos ilumina cada día.

A mis queridos Page, Bea, Esther y Amador (sí, Amador, esta vez sí que sí), por todo lo que hemos compartido estos años. Y lo que nos queda. A ver si con la vuelta de los tres chilenos recuperamos el tiempo perdido.

A Alicia, por volverme de nuevo persona. Y a Nekane, Ana y Janín por las risas y su interés en los últimos años. Aunque ahora nos veamos menos, no se os olvida, que lo sepáis.

Aunque a veces no me entienden con esto de los bichos, sé que siempre están ahí. A Ernesto, Loreto, Bea, Toño, Isa, Javi, Dácil, José, …… eterno agradecimiento por vuestro cariño y compañía desde siempre y para siempre. Besazos (y unas cañas, os vais a enterar).

A **La Familia**, por todo su apoyo; esas primas que tengo, que son un lujazo. Y sobre todo a Jorge, Toge y Mónica por ser como son y por aguantar, durante toda una vida, como soy yo.

I- INTRODUCCIÓN

"La evolución puede definirse como cualquier cambio en la frecuencia de alelos dentro de un acervo genético entre una generación y la siguiente"
(CURTIS & BARNES, 2001).

"Lo que Darwin había descubierto era el poder de un algoritmo"
(DENNETT, 1999).

"La evolución consiste en cambios heredables que modifican el desarrollo. La evolución morfológica puede ser definida como cambios en los procesos de desarrollo durante la filogenia"
(OSTER & ALBERCH, 1982).

"Evolución es el control del desarrollo por la ecología"
(VAN VALEN, 1973).

A pesar de la aparente disparidad de las definiciones que hemos elegido para encabezar el trabajo, existe un claro consenso o aceptación sobre el significado del término evolución. La evolución es el proceso por el que se originan y se diversifican las formas biológicas, a través de un mecanismo de descendencia con modificaciones (FUTUYMA, 1998). Todos los organismos vivos descendemos de unos antepasados primitivos, que a su vez descendían de otros antecesores con características más primitivas. La biología evolutiva es la rama de la ciencia que intenta, por un lado, remontar estas genealogías hasta descifrar y completar lo que se podría llamar el "árbol de la vida", una representación de las relaciones de parentesco (relaciones evolutivas) entre todos los organismos desde el origen de la vida hasta la actualidad, a la vez que pretende, por otro lado, explicar los mecanismos que han generado esta evolución (MAYR, 1976). Esta segunda cuestión, el análisis de los factores implicados en el proceso evolutivo, ha sido la más controvertida desde el planteamiento de la teoría de la evolución por DARWIN (1859), como queda reflejado en las definiciones elegidas a modo de ejemplo. ¿Cuáles son los factores causantes del proceso evolutivo? ¿Cuál es la importancia relativa de cada uno de ellos?

Los seres vivos se caracterizan por su diversidad, diversidad que puede ser analizada a muy diferentes niveles. El estudio de los procesos evolutivos implica el entender la naturaleza de la variabilidad que observamos, entender también los procesos por los que se genera dicha variabilidad, así como los factores que afectan o delimitan los patrones de distribución de esta variabilidad. La forma de abordar estas cuestiones ha cambiado substancialmente desde la aparición del "Origen de las Especies" (DARWIN, 1859), trabajo que sentó las bases de la biología evolutiva tal como la entendemos hoy en día.

Darwin explica la diversificación de los organismos por un proceso de selección natural de las variantes fenotípicas que se generan. En la idea darwinista de evolución, por tanto, priman dos aspectos: un primer proceso de generación de la variabilidad y un segundo proceso de selección de las variantes mejor adaptadas al medio. La verificación

empírica de los mecanismos implicados en ambos tipos de procesos ha sido desde entonces uno de los objetivos de la biología evolutiva. El redescubrimiento en el inicio del siglo veinte de los trabajos de Mendel sobre la transmisión hereditaria de los caracteres, que de algún modo marcó el inicio de la genética como ciencia moderna, fue clave en este sentido. Aunque en un principio no se entendieron dentro de la lógica darwinista, a partir de 1930 se empezó a integrar la genética con la teoría darwinista, dando lugar a una nueva visión del proceso evolutivo, que finalmente se consolidaría como la Nueva Síntesis (o Síntesis Neodarwinista) en los años 1930 y 1940 (Dobzhansky, 1937; Fisher, 1930; Haldane, 1932; Mayr, 1942). Esta Nueva Síntesis plantea principalmente un nuevo armazón teórico y esencialmente matemático que integra darwinismo, mendelismo y genética de poblaciones. El neodarwinismo incide en la mutación genética como fuente básica de variación y en el papel de la selección natural como motor del proceso evolutivo. La evolución pasa a representar cambios en las frecuencias génicas de las poblaciones. Podríamos encajar en este contexto la primera definición con la que encabezábamos el trabajo: la evolución representaría cualquier cambio en las frecuencias alélicas en un acervo genético entre generaciones. La investigación en biología evolutiva ha seguido básicamente las líneas de la Nueva Síntesis desde su consolidación. Una de las derivaciones del planteamiento neodarwinista ha sido el llamado "paradigma adaptacionista", paradigma central en la biología evolutiva actual, que incide en los procesos de adaptación y selección como las fuerzas imperantes en la naturaleza, suficientes para explicar todo el proceso de la evolución.

A partir de 1970, sin embargo, surge una nueva corriente que intenta recuperar y reincorporar a la biología del desarrollo dentro de los estudios evolutivos (Bonner, 1982; Gould, 1977), por medio del análisis, desde una perspectiva contemporánea, de los conceptos de la embriología del siglo XIX. Esta nueva percepción del proceso evolutivo tiene sus orígenes en el paralelismo, planteado con distintas formulaciones a lo largo de la historia, entre el patrón de organización de los seres vivos - la filogenia - y el patrón de desarrollo de los individuos - la ontogenia - (Rosas, 1989). Desde las interpretaciones preevolutivas como la "Gran Cadena de los Seres" o las leyes de von Baer (1828), hasta la ley de la recapitulación de Haeckel (1866) ("la ontogenia recapitula la filogenia") ya dentro de la lógica darwinista, el análisis de los procesos de desarrollo ha constituido uno de los aspectos claves en el estudio de la naturaleza. Sin embargo, una de las consecuencias de la aparición de la genética como ciencia moderna fue la transformación de la embriología comparada que se llevaba a cabo a finales del siglo XIX en una embriología experimental en la que se había eliminado de sus planteamientos el componente histórico, filogenético. Esto, unido al planteamiento de la síntesis neodarwinista, condujo a la eliminación del estudio de la ontogenia dentro de la biología evolutiva. Por tanto, la nueva corriente de pensamiento que mencionábamos anteriormente surge con el objetivo principal de intentar paliar esta carencia.

Esta nueva perspectiva, inspirada en la idea de "trayectoria epigenética" de Waddington (Rosas, 1989; Rosas & Buscalioni, 1997), entiende la evolución como el resultado de las modificaciones de los procesos dinámicos del desarrollo (Alberch, 1982),

basándose en el concepto de "programa de desarrollo", definido como "un conjunto de reglas morfogenéticas que determinan la estructura y los cauces de variación de las entidades biológicas" (Rosas & Buscalioni, 1997). Los programas de desarrollo poseen interesantes propiedades como son la canalización, los fenómenos umbral o la direccionalidad, que se traducen en la generación durante los procesos de desarrollo de una serie de morfologías discretas no continuas, con unos límites bien definidos, sin que puedan existir morfologías intermedias entre los diferentes límites (Alberch, 1982; Oster & Alberch, 1982). Estas limitaciones o restricciones del desarrollo ("developmental constraints") definidas como "cualquier sesgo en la producción de las variantes fenotípicas causado por la estructura, el carácter, la composición o la propia dinámica del sistema de desarrollo" (Maynard-Smith *et al.*, 1985), así como el resto de características de los sistemas dinámicos de desarrollo, representan uno de los objetos de análisis en esta nueva corriente: antes de interesarse por los procesos de selección de variantes fenotípicas, se intenta analizar desde un punto de vista ontogénico qué variantes pueden generarse y cómo se generan. Aunque no se le niega su importancia, se considera que la selección natural estaría más bien implicada en procesos de adaptación ecológica de los organismos, pero no sería suficiente para explicar los procesos supraespecíficos (macroevolutivos). En este contexto, la evolución se definiría haciendo especial hincapié en los procesos de desarrollo como motor evolutivo, como planteábamos en una de las definiciones del inicio (Oster & Alberch, 1982).

En la actualidad, estamos asistiendo a lo que se podría llamar una nueva síntesis, (Schlichting & Pigliucci, 1998), en la que se intenta destacar el papel que desempeña el ambiente como modulador de la expresión fenotípica a través de la regulación epigenética de los procesos de desarrollo, integrando así la perspectiva genética, ontogénica y ambiental. El ambiente no es un mero escenario en el que los individuos se desarrollan, sino que interactúa directamente con el desarrollo y evolución de los organismos. Con este nuevo contexto epigenético se pretende conocer más en profundidad las reglas que determinan la evolución fenotípica, a través del análisis de procesos tales como las normas de reacción, la plasticidad fenotípica o la alometría.

En el trabajo que presentamos a continuación, analizamos desde tres perspectivas diferentes la aparición de una novedad evolutiva en el urodelo *Salamandra salamandra*, la salamandra común. En concreto, emplearemos una aproximación filogeográfica, otra ontogenética y una tercera epigenética, para analizar los mecanismos, los procesos y las implicaciones evolutivas de la aparición de una nueva estrategia reproductora, el viviparismo, en la salamandra común en la Península Ibérica.

1. Novedades evolutivas

Tradicionalmente, los patrones de diversificación se ha estudiado desde un punto de vista adaptacionista; las novedades evolutivas juegan en este tipo de aproximaciones un papel determinante. Desde la perspectiva neodarwinista, las novedades

evolutivas se definen como innovaciones estructurales o funcionales, que difieren cualitativamente del carácter a partir del cual se han originado, y que permiten al linaje entrar en una nueva zona del paisaje adaptativo (Nitecki, 1990): las novedades son consideradas catalizadores del proceso evolutivo. Dentro de esta definición se incluyen tanto los procesos generadores de la innovación como las estructuras resultantes. Además, aunque generalmente se hace referencia a novedades morfológicas, hay que destacar que éstas también pueden ser fisiológicas o etológicas (Galis, 2001). Hay varias ideas ligadas implícitamente a este concepto de novedad. Se asocia la idea del surgimiento de la novedad con una posterior radiación adaptativa del linaje en el que ha surgido, existiendo una relación de causalidad entre ambas: la aparición de innovaciones se utiliza para justificar los patrones de diversificación o de mantenimiento de la diversidad en un clado determinado, dado que se relaciona (siempre dentro de este razonamiento neo-darwinista) la transición a una nueva zona del paisaje evolutivo con la consiguiente radiación con procesos macroevolutivos (origen de linajes superiores).

El concepto de novedad evolutiva no está exento de controversias. La primera atañe al propio origen de la novedad (Charlesworth, 1990; Schlichting & Pigliucci, 1998). Se puede explicar la aparición de una estructura compleja por una acumulación gradual de pequeños cambios de los elementos que componen dicha estructura. En este caso se consideran los genes como factores independientes, cuyo efecto aditivo determina el fenotipo. La selección natural es el único catalizador del cambio fenotípico. Esta visión podría relacionarse con Fisher y el Teorema Fundamental de la Selección Natural (Schlichting & Pigliucci, 1998). Por otra parte, el origen de la novedad podría deberse a una única mutación que implicase una serie de cambios concurrentes, que desembocarían en un fenotipo nuevo y enteramente funcional. En cierto sentido, esta visión saltacionista Goldschmidtiana podría tener cierta similitud con las aproximaciones internalistas llevadas a cabo por la nueva biología evolutiva del desarrollo (ver, por ejemplo, Alberch, 1980; Alberch & Blanco 1993; Gould, 1977; Hall, 1992). Por último, según Wright, aparte de la selección natural, existen factores internos como la epistasia o la pleiotropía genética, factores poblacionales como la deriva génica, y factores ambientales que son determinantes a la hora de generar y difundir las novedades evolutivas, permitiendo alcanzar a un determinado linaje nuevas zonas del paisaje adaptativo (lo que Wright dio en denominar "shifting balance theory").

En este contexto, cobra especial relevancia la nueva visión "internalista" que mencionábamos anteriormente. Su aproximación al problema de la aparición de novedades evolutivas desde un punto de vista ontogénico, partiendo de conceptos como las restricciones del desarrollo ("developmental constraints") o las heterocronías (ver capítulo III), ha sido de gran ayuda para analizar los mecanismos de generación de las novedades.

Como Cracraft (1990) advierte, un segundo punto de controversia es el nivel en el que se estudia la novedad evolutiva: habría que estudiarla en el nivel jerárquico donde los procesos que la han producido operan, esto es, en las poblaciones. En la mayoría de los trabajos que se han llevado a cabo, los análisis se centran en caracteres que definen taxones superiores, debido básicamente a la identificación de la aparición de la novedad

con la radiación y diversificación del linaje o clado. En consecuencia, en algunos casos se malinterpretan los efectos de la aparición de una novedad en un clado determinado. La correlación entre la aparición de la novedad y un proceso de especiación-diversificación acaba siendo considerada como causalidad. Esto no quiere decir que la innovación no haya influido (o incluso determinado) dichos procesos, pero las conexiones causales que influyen o afectan la radiación y la diversificación son muy complejas y su estudio en niveles jerárquicos inapropiados puede llevar a equívocos o falsas conclusiones. Una de las soluciones posibles que permite comprobar si dichas correlaciones son correctas es el estudiar innovaciones surgidas convergentemente en varios clados independientes. La otra, es trabajar, como ya hemos recalcado, en niveles de análisis propios, que en nuestro caso son las poblaciones. Como veremos más adelante, este es el planteamiento que hemos intentado desarrollar en este trabajo: el análisis de la novedad evolutiva – el viviparismo en *Salamandra salamandra* - a partir de su estudio en las zonas de contacto entre grupos de poblaciones que presentan y que no presentan la novedad.

2. El viviparismo

Conceptos

El viviparismo, en un sentido amplio, se puede definir como el mantenimiento de la progenie dentro del tracto genital (a veces en otras partes del cuerpo) de uno de los progenitores (por lo general de la madre) durante una parte o la totalidad de su desarrollo (Packard *et al*., 1989). El viviparismo ocurre en todos los grupos de vertebrados actuales con la excepción de ciclóstomos y aves (Wake, 1989). Esta estrategia reproductora ha evolucionado muchas veces e independientemente a partir de una estrategia ancestral que implicaba fertilización externa y oviparismo (puesta de huevos) (Wourms & Callard, 1992). El viviparismo, en este sentido, ha sido considerado como una novedad evolutiva ligada a la independencia del medio acuático y a la adaptación a ambientes inhóspitos y relacionada, por tanto, con la consiguiente diversificación y radiación de los clados en los que ha aparecido.

La transición oviparismo-viviparismo ha supuesto una serie de cambios morfológicos, anatómicos, ontogénicos, fisiológicos y etológicos tanto en las madres como en la progenie (Wourms & Callard, 1992). Un requisito previo para la evolución del viviparismo es la consecución de una fertilización interna, lo que implica modificaciones tanto en el gameto femenino (p.ej., pérdida de membranas) como en los gametos masculinos (p. ej., favoreciendo su motilidad), así como en los tractos genitales femeninos y masculinos y en el comportamiento durante la cópula. Se establecen, además, nuevas relaciones entre la madre y la progenie (Wourms, 1981), relaciones en las que están implicados procesos endocrinos, inmunológicos, osmorregulatorios, respiratorios, nutritivos, etológicos y de desarrollo. Existen dos patrones de relación nutricional entre la madre y su prole. Los embriones, dentro de la madre, pueden alimentarse exclusivamente del vitelo del huevo (lecitotrofia) o puede existir un aporte extra de nutrientes por parte de la madre vía ingesta directa, a través de una placenta o algún órgano análogo. Esta distinción ha

sido utilizada por muchos autores para reconocer dos modelos reproductores diferentes: ovoviviparismo (el primer caso, lecitotrofia), y viviparismo, donde siempre existiría un aporte activo de nutrientes por parte de la madre (Wake, 1989; 1992).

Existen muchas similitudes entre las soluciones adoptadas para resolver esta especialización estructural y fisiológica en los diferentes grupos donde el viviparismo ha surgido (Wake, 1992). Las similitudes implican, en algunos casos, homología (rasgos derivados de un ancestro común) y, en otros, procesos homoplásicos (convergencias y paralelismos), por lo que el estudio comparado del viviparismo en las diferentes líneas donde ha surgido se hace indispensable, a la vez que muy útil a la hora de determinar la relación entre aparición de la innovación y diversificación del clado.

Como decíamos anteriormente, la aparición de las innovaciones evolutivas y en este caso del viviparismo, ha sido generalmente estudiada desde un punto de vista adaptacionista a veces un tanto circular y reduccionista (Andrews *et al.*, 1997; Guillette *et al.*, 1980; Mathies & Andrews, 1995; Méndez-De la Cruz *et al.*, 1998). Se asume desde un principio su condición de adaptación causante de una radiación, para pasar luego a intentar descubrir los factores ecológicos inductores o incluso causantes de la transición. Es más, la existencia de especies vivíparas en todos los grupos de vertebrados es considerada como una prueba de que existe una presión selectiva determinada que favorece el paso del oviparismo al viviparismo. Pero ¿qué factores ecológicos han inducido la aparición del viviparismo en los distintos grupos de vertebrados? No es fácil encontrar una respuesta, por la dificultad que supone distinguir entre los factores que han promovido en un primer momento la transición hacia el viviparismo, los que han impulsado la radiación de las especies vivíparas, e incluso los que mantienen esta diversificación en la actualidad. Éste es otro de los problemas que se plantean al intentar analizar cualquier proceso de innovación biológica.

El viviparismo en anfibios

En los anfibios modernos (Lissamphibia), la retención oviductal de embriones en desarrollo ocurre en los tres órdenes existentes: Gymnophiona (cecilias o ápodos), Caudata (urodelos) y Salientia (anuros) (Duellman & Trueb, 1986; Wake, 1982; Wake, 1989; Wake, 1993). Se estima, por ejemplo, que el 75% de las cecilias son vivíparas. La práctica totalidad de anuros presenta fecundación externa, una clara restricción para el viviparismo. Aún así, este tipo de reproducción se ha descrito en cinco especies de anuros, aunque su incidencia sea posiblemente mayor. El 90% de las especies de urodelos tiene fecundación interna, pero sólo cinco retienen los embriones durante parte del desarrollo: *Mertensiella luschani*, *Salamandra lanzai*, *S. atra*, *S. algira* y *S. salamandra*, todas ellas incluidas en la familia Salamandridae.

No existe un consenso en la literatura herpetológica sobre la terminología adecuada a la hora de describir los diferentes modos de reproducción en anfibios. Recientemente, Packard *et al.* (1989) y Blackburn (1994) han discutido la utilidad del término ovoviviparismo, ya que es empleado para describir modos de reproducción de lo más dispares (hasta cinco patrones bien diferenciados según el último autor), y propo-

nen utilizar exclusivamente oviparismo y viviparismo. El oviparismo implicaría la puesta de huevos no fecundados, o huevos ya fecundados pero cuyo desarrollo completo ocurre fuera de la madre. El viviparismo implica un desarrollo interno de los huevos, y una posterior puesta de una progenie de vida libre, sea cual sea su estado de desarrollo (embrión, larva o juvenil). Otros autores (Wake, 1989; 1993; Wourms, 1981), además inciden en el hecho de que debe existir un aporte activo de nutrientes por parte de la madre para poder hablar de viviparismo. En este sentido, deberíamos decir por tanto que sólo existe una especie de entre las más de 400 descritas de salamandras que sea vivípara estrictamente hablando: *Salamandra atra*. Ahora bien, siguiendo estas definiciones y como discute Blackburn (1994), no existiría ningún término que nos permitiera definir y diferenciar entre los modos de reproducción distintos que ocurren, por ejemplo, en *Salamandra salamandra*. Por eso vamos a emplear los términos que se han venido utilizando hasta ahora al describir las estrategias reproductoras en esta especie, aunque hayan sido criticados en algunas ocasiones. Hablaremos, por tanto, de ovoviviparismo para definir la puesta de larvas acuáticas y de viviparismo al referirnos al nacimiento de juveniles terrestres ya metamorfoseados.

3. La familia Salamandridae. *Salamandra salamandra*. Generalidades

La familia Salamandridae comprende más de cuarenta especies pertenecientes a quince géneros distribuidos por Asia, Europa, Norteamérica y África (Barbadillo, 1987). Es considerada una familia monofilética, con monofilia diagnosticada por caracteres morfológicos como el arco fronto escamosal (Wake & Özeti, 1969) y moleculares (secuencias de ADN mitocondrial) (Titus & Larson, 1995). Los quince géneros de esta familia pueden ser divididos en dos grupos: las salamandras de vida predominantemente terrestre (*Chioglossa*, *Mertensiella* y *Salamandra*) y los tritones en sentido amplio (*Cynops*, *Echinotriton*, *Euproctus*, *Neurergus*, *Paramesotriton*, *Pachytriton*, *Pleurodeles*, *Notophthalmus*, *Salamandrina*, *Taricha*, *Triturus* y *Tylototriton*).

Fig. 1. Mapa de distribución de las especies *Chioglossa lusitanica*, *Mertensiella caucasica* y *M. luschani*.

Fig. 2: Mapa de distribución de las especies del Género *Salamandra*.

Los géneros *Chioglossa*, *Mertensiella* y *Salamandra* se encuentran localizados en la región mediterránea. *Chioglossa* es un género monotípico cuya única especie *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 se localiza exclusivamente en el noroeste de la Península Ibérica (Fig. 1). Dentro del género *Mertensiella* se ha incluido tradicionalmente dos especies, *Mertensiella caucasica* Waga, 1876 y *M. luschani* Steindachner, 1891. La primera se distribuye por el noroeste de Turquía y Georgia, y la segunda se centra en la costa meridional de Asia Menor y en algunas islas griegas y turcas (Fig. 1). La inclusión de estas dos especies en un mismo género se debe básicamente a la presencia en la base de la cola de una estructura glandular protuberante relacionada con la cópula. Sin embargo, los últimos análisis llevados a cabo a partir de datos morfológicos y moleculares sugieren que *Mertensiella* es un género parafilético (García-París *et al*., 2003; Titus & Larson, 1995; Veith *et al*., 1998; Weisrock *et al*., 2001; ver capítulo II). Dentro del género *Salamandra* se reconocen hasta el momento siete especies (Fig. 2): *Salamandra algira* Bedriaga, 1883, localizada en el norte de África; *S. atra* Laurenti, 1768, presente en los Alpes y diferenciada en dos subespecies, *S. a. atra* y *S. a. aurorae* Trevisan, 1982; *S. corsica* Savi, 1838, restringida a la isla de Córcega; *S. infraimmaculata* Martens, 1885 y *S. semenovi* Neterov, 1916, cuyo rango de distribución conjunto comprendería Turquía, Siria, Líbano, Israel, Iraq y el norte de Irán y que algunos autores consideran variantes de una misma especie; *S. lanzai* Nascetti, Andreone, Capula & Bullini, 1988, en los Alpes italianos; *S. salamandra* (Linnaeus, 1758) que se distribuye desde la Península Ibérica hasta Ucrania.

Fig. 3: Mapa de distribución de las subespecies de *Salamandra salamandra* en la Península Ibérica.

Salamandra salamandra es la especie que presenta una distribución geográfica más amplia, siendo además la más polimórfica del género. Se han descrito hasta el momento 12 subespecies, de las cuales 9 están presentes en la Península Ibérica (Fig. 3): *S. s. almanzoris* Muller & Helmich, 1935, *S. s. bejarae* Wolterstorff, 1934, *S. s. bernardezi* Wolterstorff, 1928, *S. s. crespoi* Malkmus, 1983, *S. s fastuosa* Schreiber, 1912, *S. s. gallaica* Seoane, 1884, *S. s. longirostris* Joger & Steinfartz, 1994a, *S. s. morenica* Joger & Steinfartz, 1994a, *S. s. terrestris* Lacépède, 1788. Hay que destacar que todas estas subespecies, excepto *S. s. terrestris*, son endemismos ibéricos (Buckley & Alcobendas, 2002). La subespecie nominal, *S. s. salamandra* (Linnaeus, 1758), se distribuye por centroeuropa y las Penínsulas Itálica y Helénica, llegando hasta Ucrania; *S. s. giglioli* Eiselt & Lanza, 1956 queda restringida al sur de Italia y *S. s. beschkovi* Obst, 1981 se localiza en las montañas del sur de Bulgaria. Las descripciones de las subespecies se han realizado por lo general a partir de caracteres morfológicos, principalmente los patrones de coloración y la morfología de la cabeza y del cuerpo.

El modelo básico de coloración de la salamandra común consiste en un patrón de manchas amarillas sobre un fondo negro, como ocurre por ejemplo en las subespecies *S. s. salamandra*, *S. s. almanzoris* o *S. s. longirostris* (Figs. 4 y 5). También pueden aparecer manchas rojas junto a las amarillas, como en *S. s. gallaica, S. s. morenica* o *S. s. bejarae* (Fig. 6). El patrón de manchas cambia en las subespecies *S. s. bernardezi* y

Fig. 4: Macho de *S. s. longirostris* (Fotografía de Mario García-París).
Fig. 5: Ejemplar de *S. s. bejarae* del Embalse del Porma, presentado una coloración atípica en la distribución y en el tamaño de las manchas.
Fig. 6: Ejemplar gallego de *S. s. gallaica* (Fotografía de Mario García-París).
Fig. 7: Hembra grávida de *S. s. bernardezi* en Pola de Allande (Asturias).
Fig. 8: Ejemplar de *S. s. fastuosa* de Ucieda (Cantabria).

S. s. fastuosa, que presentan un diseño típicamente rayado (rayas amarillas sobre fondo negro) (Figs. 7 y 8). Los individuos de estas subespecies son, además, de menor tamaño que el resto de salamandras de la Península y presentan un hocico redondeado que contrasta con el hocico puntiagudo característico del resto de las subespecies. Otro tipo de coloración la presenta *S. s. terrestris*, con un patrón de bandas amarillas discontinuas o de manchas redondeadas grandes (Barbadillo *et al.*, 1999; García-París, 1985; Salvador & García-París, 2001).

Salamandra salamandra requiere para sobrevivir y completar sus ciclos reproductores zonas con una humedad alta y presencia de cursos de agua (arroyos, regatos, o zonas encharcadas pero bien oxigenadas). Los bosques caducifolios de hayas, castaños o robles constituyen un hábitat idóneo para este anfibio, por la humedad acumulada en la hojarasca y en el musgo. En estos biotopos, típicos de las franjas septentrional y atlántica

Fig. 9: Castañar en Cangas de Onís (Asturias), hábitat típico de la salamandra común en la franja septentrional de la Península Ibérica.

peninsular, encontramos las poblaciones más abundantes de salamandras (Fig. 9). En el Sistema Central y las sierras del sur de la Península, también se encuentran en áreas más desprovistas de vegetación (roquedos y zonas de matorral bajo y turberas en ambientes de alta montaña) o bien en bosques más secos como pinares, encinares o alcornocales (Barbadillo *et al.*, 1999; Buckley & Alcobendas, 2002; García-París, 1985), estando en estos casos más restringidas a las cercanías de arroyos o a zonas encharcadas.

Durante el día, las salamandras adultas y subadultas suelen permanecer ocultas bajo la hojarasca o musgo, piedras, troncos, en las fisuras de tapias de piedra, en oquedades o túneles excavados por pequeños roedores en taludes de tierra. Entran en actividad al caer la noche, aunque en casos excepcionales se las puede observar fuera de sus refugios durante el día, en días lluviosos o brumosos (Barbadillo *et al.*, 1999; García-París, 1985; Salvador & García-París, 2001). Cuando empieza a oscurecer y si las condiciones climáticas son propicias (lluvia o humedad alta, sin viento y temperaturas no inferiores a 4-6 ºC), las salamandras abandonan sus refugios y buscan zonas con escasa vegetación donde alimentarse y aparearse.

4. Modos de reproducción en Salamandridae

En la familia Salamandridae encontramos tres modos de reproducción diferentes: el oviparismo, el ovoviviparismo y el viviparismo. La estrategia reproductora ancestral es el oviparismo (Duellman & Trueb, 1986) y es la más común dentro de la familia. El oviparismo consiste en la puesta de huevos en el agua, la eclosión de los huevos después de un determinado tiempo con el consiguiente inicio de la etapa larvaria acuática y, finalmente, un proceso de metamorfosis que marca el inicio de la vida terrestre. Todos los tritones, además de *Ch. lusitanica* y *M. caucasica* presentan este modo de reproducción (aunque se ha comprobado que en ciertas condiciones muy determinadas, *M. caucasica*, aun siendo una especie ovípara, retiene puntualmente los huevos dentro del tracto genital pariendo larvas acuáticas [Muskhelishvili, 1964; Tarkhnishvili & Serbinova, 1993]). El segundo modo de reproducción presente en la familia es el ovoviviparismo, que implica la retención de los huevos dentro del tracto genital materno. No hay puesta de huevos

en el agua y los embriones se desarrollan dentro de las madres hasta el momento de la eclosión, momento en el que se produce su liberación iniciándose, entonces, el periodo larvario de vida libre. Posteriormente, estas larvas acuáticas se metamorfosearán en juveniles terrestres, como en el caso anterior. Este modo de reproducción es característico de especies como *S. algira*, *S. corsica*, *S. infraimmaculata*, *S. semenovi* o *S. salamandra*. Finalmente, en un grupo de especies de la familia ha evolucionado un modo de reproducción vivíparo, en el que el desarrollo completo de los individuos desde la fecundación hasta la metamorfosis ocurre dentro del tracto genital materno. Las hembras paren juveniles terrestres, obviándose la fase acuática de desarrollo característica de los anfibios. Encontramos este tipo de reproducción en *M. luschani*, *S. atra* y *S. lanzai* en las que las hembras suelen parir uno o dos juveniles completamente metamorfoseados (Joly *et al.*, 1994; Özeti, 1979) y de forma excepcional en algunas poblaciones de *S. algira* y *S. salamandra*, como veremos a continuación.

Salamandra salamandra es una especie ovovivípara. El patrón de sus ciclos reproductores en la Península Ibérica varía entre poblaciones (Barbadillo *et al.*, 1999; Salvador & García-París, 2001). Por lo general, las cópulas se producen entre septiembre y mayo, asociadas a los periodos de lluvia otoñales y primaverales. Durante el acoplamiento, el macho deposita un espermatóforo que es absorbido por los labios de la cloaca de la hembra y almacenado en una espermateca hasta el momento de la fecundación. Las hembras pueden almacenar el esperma durante periodos muy prolongados de tiempo. La fecundación de los huevos ocurre cuando éstos pasan por los oviductos hasta los úteros, después de la ovulación (Greven & Guex, 1994). Los huevos fertilizados permanecen apilados en los úteros hasta que los individuos completan su desarrollo embrionario. Posteriormente, se producen la eclosión y la liberación de las larvas al medio acuático. El momento en el que ocurren los partos también es muy variable, dependiendo de las condiciones climáticas de cada región. Las hembras suelen parir un número variable de larvas (entre 18 y 65) de un tamaño entre 24 y 36 mm que pasan una fase de vida libre acuática antes de metamorfosearse. El desarrollo hasta la metamorfosis puede durar desde pocas semanas en ambientes xéricos o muy impredecibles hasta dos años en casos extremos (por ejemplo en *S. s almanzoris*), dependiendo de factores básicamente ambientales.

El modo de reproducción característico de *Salamandra salamandra* se ve alterado en las subespecies *S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa*. En éstas, se produce el nacimiento de juveniles terrestres ya metamorfoseados (Dopazo & Alberch, 1994; Thiesmeier & Haker, 1990), siguiendo por tanto un modo de reproducción vivíparo y obviando la fase acuática. Se ha comprobado que este patrón de reproducción puede ocurrir en algunas poblaciones de *S. algira* (Donaire, 2001; Martínez *et al.*, 1997) y también, según parece, en algunas poblaciones insulares de *S. s. gallaica* (Galán, comunicación personal). Las hembras de *S. s. bernardezi* suelen liberar entre 1 y 15 juveniles terrestres por lo general bien metamorfoseados o a punto de metamorfosearse. La secuencia completa de desarrollo, desde la fecundación hasta la metamorfosis, ocurre dentro de los úteros maternos. No existe fase larvaria acuática de vida libre. La fase larvaria no se elimi-

na del desarrollo (no es por tanto un caso de desarrollo directo), sino que transcurre en el interior de la madre en vez de en el agua.

En los ejemplos de viviparismo en la familia Salamandridae, los embriones y larvas, dentro del tracto genital materno, se alimentan, por lo general, sólo del vitelo del huevo (lecitotrofia), salvo en el caso de *S. atra*, en el que la madre también aporta una sustancia nutritiva de la cual se alimentan las larvas durante el último periodo premetamórfico (Gueux & Greven, 1994). En el caso de *S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa* se producen fenómenos de oofagia (ingesta de huevos) y adelfogagia (ingesta de larvas) intrauterinos (Dopazo & Alberch, 1994; Thiesmeier & Haker, 1990), por lo que se reduce el número de juveniles que se liberan en comparación con el número de larvas liberadas por las hembras de las otras subespecies de *Salamandra*.

No es normal encontrar en vertebrados variabilidad en los modos de reproducción dentro de una misma especie: hay algunos ejemplos en reptiles (*Lacerta vivipara* [Heulin *et al*., 1993], *Lerista bouganvillii* [Qualls *et al*., 1995] o *Saiphos equalis* [Smith & Shine, 1997]), aunque normalmente las especies presentan un modo de reproducción homogéneo en todo su rango de distribución. *Salamandra salamandra* presenta esta diversificación intraespecífica en los modos de reproducción, diversificación que además ocurre a lo largo de una distribución continua de sus poblaciones. *S. salamandra* constituye, efectivamente, un modelo excepcional a partir del cual estudiar los mecanismos de aparición de novedades evolutivas en una especie.

5. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es intentar profundizar en el estudio de los mecanismos que han generado la aparición del viviparismo en *Salamandra salamandra*. Para ello pretendemos:

1- Plantear un escenario paleobiogeográfico con el cual podremos encuadrar la aparición del viviparismo, así como explicar los procesos que han determinado su distribución actual. Para ello realizaremos un análisis detallado de la variabilidad genética de esta especie en la Península Ibérica, a partir del análisis filogenético y filogeográfico de marcadores genéticos nucleares y mitocondriales.

2- Caracterizar el viviparismo desde un punto de vista ontogénico por medio de la comparación de las secuencias de desarrollo de salamandras ovovivíparas y vivíparas desde la fecundación de los huevos hasta la metamorfosis de las larvas, de manera que podamos determinar si existe alguna relación potencial entre las variaciones en la ontogenia y la evolución de esta nueva estrategia reproductora.

3- Determinar qué influencia puede tener el ambiente, como modulador de la expresión fenotípica, en la aparición de las novedades evolutivas. Vamos a analizar de

qué manera influyen dos factores ambientales (la cantidad de nutrientes y la temperatura) en el desarrollo larvario de las salamandras y qué variabilidad fenotípica puede llegar a generarse alterando experimentalmente dichas condiciones ambientales. Relacionaremos los resultados obtenidos con la diversificación de las estrategias reproductoras en *Salamandra salamandra*.

II- EL VIVIPARISMO EN *SALAMANDRA SALAMANDRA*: UNA APROXIMACIÓN FILOGEOGRÁFICA

1. Introducción

Para analizar la aparición y evolución de una novedad evolutiva o de cualquier tipo de carácter morfológico, fisiológico o etológico en un grupo es imprescindible situarlo en un contexto filogenético. Para ello tenemos que proponer una hipótesis que represente las relaciones evolutivas entre los linajes con los que estamos trabajando (ya sean poblaciones de una especie, o especies dentro de un género, o géneros en una familia, por ejemplo). De esta forma, podremos inferir en qué momento y en qué posición de la hipótesis filogenética aparece o se transforma el carácter que queremos analizar, a la vez que podremos diferenciar entre los grupos que presentan el carácter en cuestión, cuáles derivan de un mismo ancestro común y cuáles son un producto de procesos de evolución paralelos o convergentes (homoplasias). Para establecer la hipótesis filogenética, es necesario emplear caracteres independientes de los que vamos a analizar con posterioridad, para evitar un efecto de "circularidad" en el análisis (Lee, 1999a; 1999b). Por eso, la incorporación de las nuevas técnicas moleculares a la sistemática tradicional ha servido de impulso para esta rama de la Biología. Contamos con una nueva fuente de datos en principio independientes con los que poder reconstruir filogenias y comprobar entonces nuestras hipótesis evolutivas.

La Sistemática Molecular, en la actualidad, engloba el estudio a partir del análisis de marcadores moleculares tanto de la diversidad biológica intraespecífica como interespecífica. El estudio de ambas ha sido abordado tradicionalmente por dos ramas distintas de la Biología: la genética de poblaciones y la sistemática, respectivamente (Hillis *et al.*, 1996). Estas disciplinas tienen un origen histórico diferente y se han ido desarrollando independientemente a lo largo de su historia. El uso de técnicas y metodologías comunes, entre otras cosas, ha posibilitado el acercamiento de estas disciplinas separadas o incluso enfrentadas en sus planteamientos (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000), convergiendo en la nueva Sistemática Molecular. El punto clave de unión entre las dos disciplinas lo marca el uso de un mismo tipo de herramienta: las genealogías genéticas (alélicas o haplotípicas). En cada disciplina se utilizan de una forma diferente, con objetivos relativamente distintos y, lo que es más importante, se analizan a partir de paradigmas y teorías con un origen y desarrollo independiente. Además, tampoco hay que olvidar que estamos trabajando en niveles de complejidad diferentes y que, por tanto, las propiedades de los sistemas analizados, por ejemplo poblaciones dentro de una especie o especies dentro un género, no son en absoluto las mismas. Ahora bien, existe una relación entre los dos niveles, poblacional y supraespecífico, y este nexo de unión lo marca la reproducción. En el primer nivel, la reproducción marca la relación entre los individuos. Se trata de relaciones genealógicas, tocogenéticas (ver Fig. 1, reproducida de Hennig, 1966). En el segundo nivel, asumimos que los grupos con los que vamos a trabajar (especies) forman unidades reproductoras aisladas (independientemente del concepto de

---

Parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en: García-París, M.; Alcobendas, M.; Buckley, D & Wake, D. 2003. "Dispersal of viviparity across contact zones in Iberian populations of fire salamander (*Salamandra*) inferred from disordance of genetic and morphological traits". **Evolution** 57 (1): 129-143.

Fig. 1: Relaciones tocogenéticas y filogenéticas entre individuos y especies, según HENNIG (1966).

especie con el que estemos trabajando). La reproducción entre individuos dentro de un grupo junto a la no reproducción con los individuos del resto de los grupos marca las relaciones entre ellos: en este caso no nos interesa estudiar las relaciones incluyentes, genealógicas, sino las relaciones que se basan en la exclusión, las relaciones filogenéticas. Para abordar el estudio intraespecífico, recurriremos a la teoría de la coalescencia. La teoría de la coalescencia es el nombre que en la actualidad se aplica al tratamiento matemático y estadístico formal de las genealogías de genes por lo general dentro de una misma especie (AVISE, 2000). La coalescencia es básicamente un modelo que analiza retrospectivamente los fenómenos de desaparición aleatoria de haplotipos y de deriva génica. Para abordar el análisis interespecífico, recurriremos a la sistemática filogenética. Con una misma herramienta, las genealogías alélicas, y dos interpretaciones, la teoría de la coalescencia y la sistemática filogenética, podremos estudiar un mismo fenómeno: la estructura de las ramificaciones jerárquicas dentro de los árboles evolutivos en dos niveles de complejidad biológica diferentes.

En este capítulo vamos a emplear técnicas y conceptos propios de la genética de poblaciones, la filogeografía y la sistemática molecular para acercarnos al análisis del viviparismo en *Salamandra*. En primer lugar, situaremos filogenéticamente la aparición del viviparismo en la familia Salamandridae. Como indicamos en la introducción general, en otras especies dentro de esta familia (como *M. luschani*, *S. atra* y *S. lanzai*) han evolucionado también otras formas de viviparismo que, aunque fisiológicamente diferentes del

fenómeno que observamos en la Península Ibérica, podrían estar relacionados evolutivamente. En un segundo lugar, centraremos nuestro estudio en las poblaciones ibéricas de *Salamandra salamandra*, estudiando en detalle los patrones de variabilidad genética en toda su área de distribución. A partir del análisis filogeográfico de estos datos, podremos plantear un escenario histórico en el que situar la aparición y evolución del viviparismo en *Salamandra salamandra*.

La secuenciación de ADN mitocondrial y la electroforesis de proteínas enzimáticas han sido las técnicas moleculares elegidas. La primera permite analizar de una forma directa la variabilidad de un gen del ADN mitocondrial, mientras que con la segunda pretendemos analizar de una forma indirecta la variabilidad genética del ADN nuclear a través de diferentes marcadores aloenzimáticos. Los dos tipos de ADN (nuclear y mitocondrial) tienen características y propiedades diferentes (ver más adelante); el uso combinado de marcadores nucleares y mitocondriales se presenta en la actualidad como una de las herramientas más potentes a la hora de reconstruir, a través de un análisis filogenético o filogeográfico, la historia evolutiva de un grupo.

2. Muestreos

La secuenciación de ADN mitocondrial se utilizó tanto para analizar la evolución del viviparismo en la familia Salamandridae como para el análisis filogeográfico de la variabilidad genética de *Salamandra salamandra* dentro de la Península Ibérica. La electroforesis de proteínas se empleó en el análisis de la variabilidad genética de las salamandras peninsulares. En los muestreos llevados a cabo incluimos varias poblaciones de todas las subespecies descritas en la Península Ibérica, cubriendo todo el rango de distribución de la especie. Hicimos especial hincapié en los muestreos en las zonas de contacto entre las poblaciones vivíparas y ovovivíparas, esto es, entre las subespecies *S. s. gallaica*, *S. s. bejarae*, *S. s. bernardezi*, *S. s. fastuosa* y *S. s. terrestris*.

Para el análisis del ADN mitocondrial, secuenciamos dos o tres individuos de todas las poblaciones muestreadas, incluyendo además las secuencias publicadas por García-París *et al.* (1998). La lista de individuos incluidos en esta parte del estudio puede ser consultada en el Tabla 1. Como se puede observar, hemos incluido de dos a tres individuos por población, muestreando varias poblaciones por subespecie, con el fin de poder determinar los niveles de variabilidad dentro y entre subespecies en la práctica totalidad del área de distribución de *Salamandra salamandra* en la Península Ibérica (Fig. 2). Además, también se ha incluido en el análisis ejemplares de otras especies de la familia Salamandridae (*S. atra*, *S. lanzai*, *S. algira*, *Mertensiella luschani, M. caucasica* y *Chioglossa lusitanica*) con el propósito de analizar la evolución de las diferentes estrategias reproductoras dentro de la familia. Por fin, también hemos elegido a *Triturus marmoratus* para su utilización en los análisis filogenéticos como grupo externo.

Para llevar a cabo el análisis aloenzimático, estudiamos la variabilidad genética de todas las poblaciones muestreadas, incluyendo para completar el análisis los

Tabla 1: Relación de individuos muestreados, localidades y subespecies a las que pertenecen.

Individuo	Morfotipo	Población	Localidad	Nº de campo
1	*S. s. gallaica*	1	España: Lugo: Trabada	*11H*
2	*S. s. gallaica*	1	España: Lugo: Trabada	*17M*
3	*S. s. gallaica*	1	España: Lugo: Trabada	*18H*
4	*S. s. gallaica*	2	España: Lugo: Fonsagrada	*SS22*
5	*S. s. gallaica*	3	España: Lugo: Lugo	*79M*
6	*S. s. gallaica*	3	España: Lugo: Lugo	*80H*
7	*S. s. gallaica*	4	España: Pontevedra: Castromarín	*SS24*
8	*S. s. gallaica*	5	España: Zamora: Puerto del Padornelo	*23-16*
9	*S. s. terrestris*	6	France: Haute Garonne: Arguenos	*23-13*
10	*S. s. terrestris*	6	France: Haute Garonne: Arguenos	*NS32*
11	*S. s. terrestris*	6	France: Haute Garonne: Arguenos	*NS36*
12	*S. s. terrestris*	7	España: Huesca: Benasque	*23-15*
13	*S. s. terrestris*	7	España: Huesca: Benasque	*23-26*
14	*S. s. terrestris*	8	France: Tarnet Garonne: Gresigne	*23-14*
15	*S. s. terrestris*	9	España: Girona: Setcases	*SS03*
16	*S. s. terrestris*	10	España: Barcelona: Montseny	*SS51*
17	*S. s. bejarae*	11	España: León: Palacios del Sil	*66H*
18	*S. s. bejarae*	11	España: León: Palacios del Sil	*67M*
19	*S. s. bejarae*	12	España: León: Lillo del Bierzo	*95H*
20	*S. s. bejarae*	12	España: León: Lillo del Bierzo	*96M*
21	*S. s. bejarae*	12	España: León: Lillo del Bierzo	*101H*
22	*S. s. bejarae*	13	España: León: Villablino	*35M*
23	*S. s. bejarae*	14	España: León: Isoba	*33M*
24	*S. s. bejarae*	14	España: León: Isoba	*34J*
25	*S. s. bejarae*	14	España: León: Isoba	*37J*
26	*S. s. bejarae*	15	España: León: Embalse del Porma	*72M*
27	*S. s. bejarae*	15	España: León: Embalse del Porma	*74M*
28	*S. s. bejarae*	16	España: León: Cofiñal	*69M*
29	*S. s. bejarae*	17	España: Burgos: Puerto del Escudo	*103L*
30	*S. s. gallaica*	18	Portugal: Serra da Estrella: Manteigas	*SS35*
31	*S. s. gallaica*	19	Portugal: Sintra	*SS72*
32	*S. s. gallaica*	20	Portugal: São Mamede	*26-20*
33	*S. s. bejarae*	21	España: Cáceres: Hervás-Cabezuela del Valle	*SS08*
34	*S. s. bejarae*	21	España: Cáceres: Hervás-Cabezuela del Valle	*SS48*
35	*S. s. bejarae*	22	España: Toledo: San Pablo de los Montes	*SS07*
36	*S. s. bejarae*	23	España: Avila: Mijares	*SS14*
37	*S. s. bejarae*	23	España: Ávila: Mijares	*10H*
38	*S. s. bejarae*	37	España: León: Río Oza (Ponferrada)	*64M*
39	*S. s. bejarae*	37	España: León: Río Oza (Ponferrada)	*76H*
40	*S. s. almanzoris*	24	España: Avila: Sierra de Gredos: Cinco Lagunas	*23-17*
41	*S. s. almanzoris*	25	España: Avila: Circo de Gredos	*SS10*
42	*S. s. almanzoris*	26	España: Avila: El Hornillo	*23-22*
43	*S. s. almanzoris*	27	España: Madrid: Circo de Peñalara	*SS11*
44	*S. s. almanzoris*	28	España: Madrid: Laguna de los Pájaros	*23-18*
45	*S. s. gallaica*	29	Portugal: Santiago de Caçem	*Copeia98*
46	*S. s. crespoi*	30	Portugal: Algarve: Serra de Monchique, Foia	*Copeia98*
47	*S. s. crespoi*	30	Portugal: Algarve: Serra de Monchique, Foia	*Copeia98*
48	*S. s. morenica*	31	España: Huelva: Sierra de Aracena	*Copeia98*
49	*S. s. morenica*	32	España: Córdoba: Sierra Morena	*Copeia98*
50	*S. s. morenica*	33	España: Jaén: Baños de la Encina	*Copeia98*
51	*S. s. morenica*	34	España: Albacete: Riópar	*Copeia98*
52	*S. s. morenica*	34	España: Albacete: Riópar	*Copeia98*
53	*S. s. longirostris*	35	España: Cádiz: Serranía de Grazalema	*Copeia98*
54	*S. s. longirostris*	35	España: Cádiz: Serranía de Grazalema	*Copeia98*
55	*S. s. longirostris*	36	España: Málaga: Serranía de Ronda	*Copeia98*
56	*S. s. bernardezi*	A	España: Asturias: Monasterio de Hermo	*84H*
57	*S. s. bernardezi*	A	España: Asturias: Monasterio de Hermo	*87M*
58	*S. s. bernardezi*	A	España: Asturias: Monasterio de Hermo	*89H*
59	*S. s. bernardezi*	B	España: Asturias: Puerto del Palo	*SS31*
60	*S. s. bernardezi*	B	España: Asturias: Pola de Allande	*49H*
61	*S. s. bernardezi*	B	España: Asturias: Pola de Allande	*48M*
63	*S. s. bernardezi*	C	España: Asturias: Luarca	*1H*
63	*S. s. bernardezi*	C	España: Asturias: Luarca	*75H*
64	*S. s. bernardezi*	D	España: Asturias: Oviedo	*SS05*
65	*S. s. bernardezi*	D	España: Asturias: Oviedo	*SS25*
66	*S. s. bernardezi*	D	España: Asturias: Oviedo	*79M*
67	*S. s. bernardezi*	D	España: Asturias: Oviedo	*80H*
68	*S. s. bernardezi*	E	España: Asturias: Puerto del Fito	*SS28*
69	*S. s. bernardezi*	F	España: Asturias: Pico los Cuadrazales (Amieva)	*27M*
70	*S. s. bernardezi*	F	España: Asturias: Pico los Cuadrazales (Amieva)	*28H*
71	*S. s. bernardezi*	F	España: Asturias: Pico los Cuadrazales (Amieva)	*29H*
72	*S. s. fastuosa*	G	España: Cantabria: Ucieda	*SS20*
73	*S. s. fastuosa*	G	España: Cantabria: Ucieda	*38-15*
74	*S. s. fastuosa*	G	España: Cantabria: Ucieda	*39M*
75	*S. s. fastuosa*	G	España: Cantabria: Ucieda	*40M*
76	*S. s. fastuosa*	H	España: Navarra: Lanz	*SS56*
77	*S. s. fastuosa*	H	España: Navarra: Lanz	*S94*
78	*S. s. fastuosa*	J	España: Navarra: Collado Lindux	*NS56*
79	*S. s. fastuosa*	J	España: Navarra: Collado Lindux	*SS09*
80	*S. algira*		Marruecos Xauen	*SS64*
81	*S. atra*		Suiza: cerca de Gurnigel	*Copeia98modif*
82	*S. lanzai*		France: Mount Viso	*2-mayo*
83	*Mertensiella luschani*		Turquía: Dodurg, 20 km S de Fethiye	*1*
84	*M. luschani*		Turquía: Dodurg, 20 km S de Fethiye	*2*
85	*M. luschani*		Turquía	*3*
86	*M. luschani*		Turquía	*4*
87	*Chioglossa lusitanica*		España: Asturias: Boal	CL3
88	*Mertensiella caucasica*		Turquía 40 km S def Giresun	MC1
89	*Triturus marmoratus*		España: Zamora: Sanabria	1

Fig. 2: Poblaciones de *Salamandra salamandra* muestreadas en la Península Ibérica (Ver Tabla 1, para más detalle).

datos de Alcobendas *et al.* (1996). En este caso y como grupo externo, utilizamos una población turca de *Mertensiella luschani*.

3. Secuenciación de ADN

El ADN mitocondrial ha sido extensamente utilizado en las dos últimas décadas como marcador genético en análisis de estructuras poblacionales, de flujo génico, fenómenos de hibridación, patrones biogeográficos o filogenéticos entre poblaciones, especies o taxones superiores (Avise, 1994; 1998). Posee ciertas peculiaridades que le confieren un especial interés para este tipo de estudios (Harrison, 1989; Moritz *et al.*, 1987; Zhang y Hewitt, 1996): es una molécula circular, relativamente pequeña y con una estructura y organización simples. Contiene genes que se traducen en dos ARN ribosomales (ARNr), veintidós ARN de transferencia (ARNt), y trece proteínas, la mayoría implicada en las cadenas de transporte de electrones. No suele presentar intrones, y las secuencias intergénicas suelen ser muy pequeñas o estar ausentes. Presenta además una región iniciadora de la transcripción y la replicación, que en vertebrados y equinoder-

mos se conoce como el D-Loop (del inglés Displacement-Loop) o región control. El contenido génico así como la disposición de éstos en la molécula está bastante conservado entre grupos. El tamaño de la molécula completa varía en vertebrados entre 14 y 30kbp, no recombina y presenta una herencia matrilineal. Otra característica importante es la variabilidad de las tasas de evolución entre los diferentes genes, lo que permite abordar análisis filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos.

Ahora bien, también hay que destacar los siguientes inconvenientes o posibles dificultades a la hora de trabajar con ADN mitocondrial (Ballard & Kreitman, 1995; Zhang & Hewitt, 1996). Se conocen casos en los que el ADN mitocondrial no sigue una herencia estrictamente materna (Hoeh *et al.*, 2002; Zouros *et al.*, 1994), siendo ésta paterna o biparental. También se ha descrito casos de heteroplasmia, esto es, presencia de diferentes tipos de genomas mitocondriales en un mismo individuo, con el potencial de error que esto conlleva a la hora de realizar cualquier tipo de análisis. Otras posibles fuentes de error son la no neutralidad de la secuencias analizadas, así como la presencia de secuencias nucleares similares o incluso homólogas a secuencias mitocondriales, que pueden interferir durante el proceso de amplificación y secuenciación. Por último cabe destacar que, como consecuencia de la herencia matrilineal, el ADN mitocondrial tiene un tamaño poblacional efectivo inferior al nuclear, por lo que es más susceptible a que se eliminen de una forma rápida algunos linajes (fenómeno de "rapid lineage sorting").

En nuestro trabajo decidimos en un principio secuenciar dos fragmentos del ADN mitocondrial: la región control o D-Loop y el gen codificante para el citocromo-b (cit-b). El citocromo-b es uno de los genes más ampliamente utilizados en sistemática molecular; hay una gran cantidad de secuencias disponible para todo tipo de organismos, teniendo por tanto un valor comparativo muy alto (Johns & Avise, 1998). En nuestro caso, además, ya se había empleado en otros trabajos este marcador (García-París *et al.*, 1998), por lo que su utilidad estaba ya contrastada. Por su parte, la región del D-loop tiene por lo general una tasa de evolución relativamente más alta que la del cit-b, por lo que pensamos que sería de utilidad su secuenciación para resolver posibles ambigüedades generadas tras el análisis con el cit-b. Sin embargo, Steinfartz *et al.* (2000) utilizan el D-Loop en un extenso estudio sobre las salamandras europeas y discuten la escasa variabilidad de este marcador, debida principalmente a la ausencia de determinadas regiones como la ETA S_2 o la región hipervariable que se encuentra entre la ETA S_1 y la región central del D-Loop en otros vertebrados. Esto hace que el gen en *S. salamandra* sea considerablemente más corto y menos variable. Por esto y por los buenos resultados que fuimos obteniendo con el primer marcador, centramos nuestro trabajo en el citocromo-b exclusivamente

3.1 Metodología

El proceso de secuenciación de ADN que hemos seguido consta de los siguientes pasos: (i) extracción del material hereditario, (ii) amplificación del segmento de ADN elegido, (iii) secuenciación automática de las regiones amplificadas y (iv) análisis de los resultados.

Para las extracciones se utilizó un extremo de la cola de cada individuo. Utilizamos la resina de extracción Chelex, con el siguiente protocolo:

1- Homogeneizar el material (0,5 gr de tejido aproximadamente) resuspenderlo posteriormente en 1,5 ml de tampón (200 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8). Incubar entre 30' y 1 h a temperatura ambiente.
2- Centrifugar 10' a 5000 rpm.
3- Resuspender en 0,5 ml de tampón (0,1 N NaCl, 0,01 M EDTA, 0,3 M Tris, pH 8).
4- Añadir 1 ml de tampón PBS y centrifugar 1' a 12000 rpm.
5- Desechar el sobrenadante y resuspender en 50 µl de agua destilada esterilizada.
6- Añadir 200 µl de resina Chelex en disolución al 5%.
7- Incubar a 56 ºC entre 15' y 30'.
8- Agitar con Vortex e incubar en agua hirviendo durante 8'.
9- Agitar con Vortex durante unos 10'' y posteriormente centrifugar a 12000 rpm entre 2 y 3'.

Una vez finalizada la extracción, las muestras se almacenaron a 4 ºC.

El segundo paso es la amplificación de las regiones de ADN que interesan para nuestro estudio; se necesita un gran número de copias idénticas del ADN para obtener buenas secuencias. Existen varios métodos para esto, aunque nosotros nos decantamos por la amplificación vía la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Básicamente (para más información ver por ejemplo Palumbi, 1996) una PCR consiste en la síntesis de cadenas de ADN *in vitro* a partir de una cadena molde. Para que la reacción tenga lugar, necesitamos una muestra del ADN que queremos copiar, el enzima encargado de la síntesis (una polimerasa; por lo general se utiliza la "Taq polimerasa", enzima proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*), oligonucleótidos específicos iniciadores de la síntesis de ADN (cebadores o primers), nucleótidos (dNTPS) y una solución tamponada que mantenga las condiciones estables durante el tiempo que dura la reacción. Fue precisamente la posibilidad de purificar y usar la Taq polimerasa (Mullis & Faloona, 1987), enzima estable a altas temperaturas, lo que permitió que se extendiera el uso de la PCR.

La reacción de la PCR consiste en un ciclo compuesto de tres fases, que se repite tantas veces como se quiera. Estas fases son (i) desnaturalización de las cadenas de ADN, (ii) apareamiento de los cebadores y (iii) síntesis activa de las copias de ADN.

Para amplificar el gen o la zona del gen que deseamos, un paso crítico es el diseño o la elección de los cebadores. Los cebadores suelen ser oligonucleótidos de entre 25 y 35 pares de base, diseñados para que se unan a ambos lados de la región que nos interesa, y a partir de los cuales se inicia la síntesis de las dos cadenas complementarias de ADN. En nuestro caso, utilizamos dos pares de cebadores. Para amplificar la región del D-Loop, diseñamos un par de cebadores a partir de secuencias de *Ambystoma tigrinum*, *A. velasci*, *A. rosaceum*, *Mertensiella luschani, Rana catesbiana* y *Xenopus laevis* obtenidas en el GenBank. El primer cebador reconoce una región del ARNt Prolina, mientras

que el segundo reconoce otra del ARNt Fenil Alanina, flanqueando ambas al D-Loop. Las secuencias de los cebadores nuevos son las siguientes:

PRO-1: CGC CAC TGG CAC CCA AGG CCA AAA TTC T (5'-3')
PHE-2: TAT CTT CAG TGC YGC GCT TTW ATT TAA (5'-3')

Para amplificar esta región con los cebadores diseñados, seguimos el siguiente ciclo de PCR:

Desnaturalización: 60'' a 94 ºC
Apareamiento de los cebadores: 60'' a 56 ºC
Síntesis de ADN: 50'' a 72ºC

Antes del primer ciclo, elevamos la temperatura de la muestra a 94 ºC durante 5', para la completa desnaturalización de todas las hebras de ADN. Luego, el ciclo de amplificación se repite 35 veces. La amplificación se llevó a cabo en 50 ml, bajo condiciones estándar (Kocher *et al.*, 1989). Transcurridos los 35 ciclos, pusimos a migrar una muestra (4 ml) del producto de PCR en un gel de agarosa al 1,5% y teñido con bromuro de etidio para comprobar si la reacción había funcionado y calcular el tamaño del fragmento amplificado. Si los resultados eran correctos, las muestras de ADN amplificado se purificaban por medio de columnas de purificación BIOCLEAN CBiotools B & M Lab. S.A., para su posterior secuenciación. La secuenciación automática se llevó a cabo en el C.I.B. (Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid), por medio de un secuenciador ABI™ 377 (Perkin Elmer). En todos los casos se secuenciaron las dos cadenas complementarias para asegurar los resultados obtenidos.

Siguiendo este protocolo, secuenciamos la región del D-Loop (780 pb) de cuatro individuos. Tanto el tamaño como las secuencias en sí concuerdan con las presentadas por Steinfartz *et al.* (2000).

Para la amplificación del citocromo b (cit-b), utilizamos los cebadores ya descritos cyt-b2 (Kocher *et al.*, 1989) y MVZ-15 (Moritz *et al.*, 1992).

CYT-B2: AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A (5'-3')
MVZ-15: GAA CTA ATG GCC CAC ACW WTA CGN AA (5'-3')

Para amplificar este segmento de ADN, seguimos el siguiente ciclo de PCR:

Desnaturalización: 60'' a 94 ºC
Apareamiento de los cebadores: 50'' a 45 ºC
Síntesis de ADN: 45'' a 72ºC

De nuevo, iniciamos la reacción con una desnaturalización completa del ADN (5' a 94ºC), y repetimos el ciclo descrito 35 veces. Amplificamos una región de 385 pb del citocromo b de 89 individuos. Como en el caso anterior, limpiamos los productos de la

PCR por medio de las columnas de purificación BIOCLEAN, y procedimos a su secuenciación automática en el C.I.B. Posteriormente alineamos todas las secuencias por medio del programa SeqEd 1.03 (©Applied Biosystems Inc, 1992).

Para nuestra matriz de datos, calculamos las frecuencias de cada base, los índices de transiciones y transversiones y las curvas de saturación de las secuencias.

Reconstrucción filogenética

Para establecer una hipótesis filogenética que refleje las relaciones evolutivas entre los marcadores analizados empleamos tres métodos distintos de reconstrucción.

En primer lugar, utilizamos un método de distancia. Los métodos de distancia se basan en el reagrupamiento de las poblaciones a partir de sus distancias genéticas. Existen dos grandes grupos de técnicas utilizadas: los análisis de agrupamiento ("Cluster analysis") y los árboles aditivos ("Additive trees") (Swofford *et al.*, 1996). Dentro de los análisis de agrupamiento, el método más ampliamente utilizado es el denominado UPGMA (del inglés "Unweighted Pair Group Method with arithmetic Averages") (Sneath & Sokal, 1973). Para obtener un dendrograma, el UPGMA va agrupando las secuencias más similares entre sí. En este sentido, es un método fenético de análisis. Con el UPGMA se asume que las tasas de evolución son iguales en todas las ramas del dendrograma obtenido. Por otra parte, con los árboles aditivos, asumimos que la suma de la longitud de las ramas entre dos linajes (y la longitud total del árbol) tiene un significado biológico real. Dentro de este grupo se encuentran los árboles de Wagner (Farris, 1970; 1972) o del "Vecino más Próximo" (Neighbor-Joining) (Saitou & Nei, 1987). Se asume que las distancias observadas pueden ser más bajas que las distancias reales (lo que puede ser biológicamente posible si las distancias no están corregidas para la repetición de cambios en una misma posición) (Swofford *et al.*, 1996). Por eso a veces la suma de la distancias de las diferentes ramas excede las distancias observadas. Se intenta buscar entonces el árbol con la longitud total más baja. En cierta medida se puede decir que este método no es un método de búsqueda puramente algorítmico como los anteriores ya que incluye cierto criterio de optimación de los árboles obtenidos por esta búsqueda. El árbol resultante no está enraizado y no implica igualdad en las tasas de evolución entre ramas. Para el primer análisis de las secuencias de ADN, decidimos llevar a cabo un Neighbor-Joining. Llevamos a cabo este análisis con el programa PAUP* 4.0b10 ("Phylogenetic Analysis Using Parsimony") (Swofford, 2000), realizando además un bootstrap (1000 réplicas) para determinar la significación de la topología inferida.

En el segundo grupo de análisis que llevamos a cabo, análisis cualitativos, se incluyen dentro de la búsqueda algorítmica un armazón filosófico y metodológico (Cladismo) a la vez que un criterio de optimización (Parsimonia) (Swofford *et al.*, 1996). Los individuos ya no van a relacionarse por su similitud fenotípica (análisis fenéticos del apartado anterior), sino por la presencia de caracteres derivados compartidos (sinapomorfías). La metodología cladista implica (i) definir los caracteres y los estados en los que se presentan, (ii) definir la relación entre los estados de los caracteres (ordenar), (iii) definir la polaridad de los caracteres (relación ancestro-descendiente) y (iv) realizar la búsqueda de la

hipótesis filogenética más parsimoniosa. Aunque el tratamiento cladista de los datos moleculares ha recibido ciertas críticas por la dificultad de ordenar y polarizar los estados de carácter (WÄGELE, 1994), decidimos llevar a cabo este tipo de análisis para comparar los resultados con las otras hipótesis filogenéticas generadas. También realizamos este tratamiento con el programa PAUP* 4.0b10, a través de una búsqueda heurística, eligiendo la opción de "adición aleatoria de los taxones" ("random stepwise addition") con 10 réplicas y con una posterior optimación de las topologías obtenidas con la opción denominada "intercambio de ramas con TBR" ("Branch swapping with Tree Bisection-Reconnection"). Repetimos los análisis pesando diferencialmente las transiciones y las transversiones (5:1), para tener en cuenta su diferente incidencia en nuestras secuencias. Asimismo, llevamos a cabo un "bootstrap", con la opción de búsqueda heurística (10.000 réplicas). Finalmente realizamos un "Decay Analysis" con el programa AutoDecay 4.0.1 (ERIKSSON, 1998) para comprobar la robustez de los clados generados en los distintos análisis. Para determinar la polaridad de los caracteres en los análisis, enraizamos los árboles con un grupo externo. Elegimos una secuencia de *Triturus marmoratus,* especie perteneciente al grupo hermano de las salamandras en sentido amplio dentro de la familia Salamandridae (TITUS & LARSON, 1995, WAKE & ÖZETI, 1969).

El tercer método de análisis empleado fue el de "Máxima Verosimilitud". El método de "Máxima Verosimilitud" (Maximum Likelihood) es un método probabilístico: evalúa una hipótesis filogenética en términos de la probabilidad de que un determinado modelo evolutivo propuesto haya dado lugar o explique los datos observados (en este caso las secuencias) (HUELSENBECK & CRANDALL, 1997; SWOFFORD *et al.*, 1996). Los modelos empleados describen cómo se sustituyen las bases en las secuencias observadas. Existen muchos modelos descritos, desde el más simple como por ejemplo el de Jukes-Cantor (JC69), en el que los cuatro tipos de bases tienen las mismas frecuencias y los cambios entre nucleótidos se producen con una tasa uniforme, hasta modelos mucho más complejos que implican sesgos y alteraciones de diversa índole en las frecuencias y tasas de sustituciones. El método de Máxima Verosimilitud evalúa la probabilidad total de que el modelo evolutivo propuesto pueda generar las secuencias observadas; las filogenias que se infieren a partir de este método son las que tienen unos valores de probabilidad más altos. En nuestro caso, y para calcular el modelo al que mejor se ajustaban las secuencias obtenidas, utilizamos el programa ModelTest 3.0.6 (POSADA & CRANDALL, 1998). Por su parte, a la hora de evaluar un árbol generado, el método de Parsimonia ignora la longitud de las ramas, mientras que el método de Máxima Verosimilitud no (de hecho, la estimación de la longitud de las ramas es uno de los pasos claves de este método), considerando que es más probable que ocurran más cambios en las ramas largas que en las cortas. Esta diferencia explica por qué en algunos casos el método de Máxima Verosimilitud es más eficaz que el de parsimonia. De nuevo, empleamos el programa PAUP* 4.0b10 para llevar a cabo este análisis, incluyendo los parámetros especificados por el ModelTest y utilizando la opción de búsqueda heurística rápida con bootstrap (100 réplicas). Además, también realizamos un "análisis bayesiano" de nuestros datos a través del programa

"Mr. Bayes 2.01" (HUELSENBECK & RONQUIST, en prensa). Este tipo de análisis se basa en la utilización de probabilidades *a posteriori*, probabilidades que están basadas en el modelo evolutivo elegido y la matriz de datos, pero recalculadas para cada árbol después de cada análisis. El análisis "bayesiano" consiste básicamente en comparaciones de máxima verosimilitud entre árboles, en las que las topologías de éstos y los parámetros de verosimilitud se permutan a través de un método de búsqueda de "Markov Chain Monte Carlo", muestreando periódicamente un número determinado de reconstrucciones. A diferencia del método de máxima verosimilitud en el que se obtiene un único árbol final (el árbol con la probabilidad más alta para poder observar nuestros datos dada la topología generada), con el análisis "bayesiano" se obtiene el conjunto de árboles que tiene la probabilidad más alta de contener los datos observados. La frecuencia de muestreo de cada topología es su probabilidad y la suma de las probabilidades de este conjunto de árboles es uno. Podemos, por tanto, elegir un subgrupo dentro del conjunto que represente las topologías más probables con un intervalo de confianza del 95%, por ejemplo. Además, el programa también calcula la probabilidad *a posteriori* de cada clado, determinada por la suma de probabilidades de cada árbol que contiene ese clado. Esta probabilidad puede ser interpretada como un índice de robustez de ese clado (semejante a un valor de bootstrap). Para nuestro análisis, utilizamos las especificaciones del modelo HKY+G. Generamos 500.000 árboles en cuatro cadenas de búsqueda independientes partiendo del mismo árbol inicial, muestreando uno de cada cien árboles. Se eliminaron del análisis los primeros 1000 árboles guardados, ya que al inicio del análisis existen más posibilidades de dar por buenas topologías que al final resultan menos exactas.

Análisis filogeográfico

La filogeografía es un campo de estudio relativamente reciente (AVISE *et al.*, 1987) que se ocupa de los principios y procesos relacionados con la distribución geográfica de los linajes, trabajando siempre bajo una perspectiva filogenética y, por lo general, a un nivel intraespecífico (AVISE, 1998; 2000). La incorporación de las técnicas moleculares a la sistemática ha sido decisiva para esta disciplina, que en la actualidad se basa casi exclusivamente en el análisis de la distribución geográfica de marcadores moleculares, por lo general de haplotipos mitocondriales. El estudio filogeográfico de un grupo pretende fundamentalmente interpretar de una forma cualitativa y cuantitativa los procesos demográficos poblacionales que se han ido sucediendo a lo largo de su historia. Para ello analizamos la distribución geográfica actual de marcadores moleculares, revelando e interpretando los posibles rastros o huellas evolutivas que dichos procesos han ido dejando en estos marcadores (AVISE, 2000).

Para realizar un análisis filogeográfico el primer paso necesario es definir las relaciones evolutivas entre los individuos o entre sus marcadores moleculares. Para eso se suelen emplear por lo general métodos de reconstrucción filogenéticos. Como destacan TEMPLETON *et al.* (1992) y TEMPLETON *et al.* (1993) este tipo de métodos de reconstrucción se basa en supuestos que pueden llegar a estar en contradicción con las propiedades de

los datos moleculares poblacionales intraespecíficos que estamos manejando. El hecho, por ejemplo, de que no se puedan considerar en el análisis fenómenos de hibridación o de reticulación choca frontalmente con las relaciones genealógicas establecidas en el nivel de análisis en el que estamos trabajando (nivel tocogenético más que filogenético, HENNIG, 1966). Asimismo, los métodos filogenéticos asumen que los estados de carácter ancestrales, por lo general, no van a encontrarse en las poblaciones actuales; encontraremos normalmente estados de carácter derivados. Sin embargo, al reconstruir las relaciones genealógicas entre linajes moleculares, la teoría de la coalescencia en la que se basa la reconstrucción (HUDSON, 1990; NEIGEL & AVISE, 1993) predice justamente lo contrario: los haplotipos más frecuentes en una población suelen ser los más antiguos. Por todo eso se han propuesto diferente métodos alternativos para llevar a cabo reconstrucciones genealógicas intraespecíficas (POSADA & CRANDALL, 2001). La mayoría de ellos puede considerarse métodos fenéticos de análisis ya que se basan en la similitud de las secuencias o haplotipos. El método que vamos a utilizar nosotros, el análisis de "Clados Encajados" (Nested Clade Análisis o NCA, TEMPLETON *et al.*, 1992; 1993; TEMPLETON, 1995), se define como un método "cladístico" ya que reconstruye las relaciones entre los haplotipos a partir de las diferencias en los estados de sus caracteres y utilizando la parsimonia como método de optimación (aunque ver de nuevo WÄGELE, 1994 para una crítica de la "cladística molecular").

Este tipo de análisis se realiza en tres pasos sucesivos. En un primer paso, se establecen las relaciones genealógicas entre todas las secuencias de ADN. Para ello, generamos una red de haplotipos con el programa TCS 1.13 (CLEMENT *et al.*, 2000), basado en los algoritmos de parsimonia propuestos por TEMPLETON *et al.* (1992; 1993). El programa colapsa en primer lugar las secuencias idénticas en haplotipos y calcula sus frecuencias. En segundo lugar, se establece el límite estadísticamente significativo de parsimonia (0,095), que indica a partir de qué número de pasos no se puede justificar que dos haplotipos puedan estar por parsimonia conectados en la red. Finalmente, el programa calcula y dibuja la red, conectando sucesivamente los haplotipos que difieren en una base. Una vez establecida la red de haplotipos, el segundo paso consiste en realizar el análisis encajado. Empezando por los extremos de la red, los haplotipos (clados de "0 pasos") que difieren en una base se agrupan en los llamados "clados de 1 paso". Luego los "clados de 1 paso" que difieren en una mutación se agrupan en "clados de 2 pasos" y así sucesivamente hasta que toda la red de haplotipos haya sido encajada en algún nivel de análisis. El análisis de Clados Encajados también fue realizado con el programa TCS 1.13. El tercer paso a seguir en el estudio filogeográfico es analizar estadísticamente la relación entre la red de haplotipos y la localización geográfica de éstos. Para ello, utilizamos el programa GeoDis 2.0 (POSADA *et al.*, 2000). En la matriz de entrada para este programa se incluyen las coordenadas geográficas de las poblaciones muestreadas. Así, el programa calcula dos distancias distintas para todos los niveles encajados del análisis. Primero establece para los individuos con un mismo haplotipo (o pertenecientes a un mismo clado, en los niveles de análisis superiores) un centro geográfico y calcula la distancia de cada individuo a este centro. La media de

todas las distancias calculadas es la llamada distancia del clado (D_C), distancia que mide el grado de dispersión de los individuos dentro de ese haplotipo o clado. En segundo lugar, se calcula la distancia de todos los individuos de una clado o haplotipo al centro del clado o haplotipo con el que se encuentra conectado en el mismo nivel de análisis. La media de todas las distancias es la llamada distancia encajada (D_N) y mide el grado de dispersión de los individuos de un clado con respecto a los individuos del clado relacionado en ese mismo nivel. Además, también se calcula las diferencias medias de estas dos distancias entre los clados situados en los extremos ("Tip clades") y los clados interiores ("Interior clades") ($I\text{-}T_{DC}$ e $I\text{-}T_{DN}$). Aunque la red de haplotipos no está enraizada, los haplotipos o clados situados en los extremos suelen ser más recientes que los clados interiores (Castelloe & Templeton, 1994). Por tanto, estas distancias contrastan las diferencias entre los patrones de dispersión geográfica de los clados más recientes respecto a los más antiguos.

El análisis estadístico de todas estas distancias nos permitirá establecer si existe algún tipo de relación entre la distribución de los haplotipos en la red y su localización geográfica. Como hipótesis nula se plantea que no existe ninguna relación entre la variabilidad haplotípica y la variabilidad geográfica. Si se rechaza la hipótesis nula, se asume que existe o ha existido una restricción o alteración en el patrón de movimientos, en el flujo de los individuos y por tanto de flujo génico. A través del análisis estadístico de la distribución de los haplotipos en la geografía y su interpretación a partir de las claves propuestas por Templeton (1995) y modificadas por Posada *et al.* (2000) se infieren los tipos de sucesos demográficos que han moldeado la estructura poblacional que observamos (fragmentaciones, recolonizaciones, expansiones). Gracias a este análisis, podremos inferir con más exactitud los procesos poblacionales y demográficos que han definido la aparición y la evolución del viviparismo en las salamandras ibéricas.

3.2 Resultados

Obtuvimos un total de 89 secuencias de 385 pares de bases cada una (372 pares de bases utilizados para el análisis) que se corresponden con los codones 7 al 135 del citocromo b de *Xenopus laevis* (Roe *et al.*, 1985). En el Apéndice I mostramos los cambios entre todas las secuencias. Uno de los problemas que podemos encontrar al utilizar este tipo de datos es el de la saturación, la superposición de cambios en una misma posición, fenómeno que se produce cuando no existe cierta concordancia entre la variabilidad del marcador utilizado y el tiempo de divergencia entre los taxones analizados. Para comprobar si existía este problema en nuestros datos comparamos la relación entre el número de cambios absoluto y las distancias sin corregir "p" tanto para las transiciones y las transversiones en las tres posiciones de los codones, como en las secuencias en general. Como se puede observar en las gráficas (Fig. 3), existe una relación lineal entre las variables, lo que indica ausencia de saturación de las secuencias. Esta relación lineal empieza a ser asintótica (señal de saturación) a partir de una diferenciación del 18%. Esto

Fig. 3: Curvas de saturación de las secuencias de ADN. "**Abs**": distancias absolutas; "**p**": distancias sin corregir; "**Ti**": Transiciones; "**Tv**": Transversiones; "**1st, 2nd, 3rd**": primeras, segundas y terceras posiciones, respectivamente.

significa que el marcador utilizado puede subestimar las distancias y los tiempos de divergencia entre taxones con una divergencia del 18%, lo que en nuestro caso sólo ocurre entre géneros. Por tanto, el citocromo b es un marcador válido para el análisis poblacional que estamos llevando a cabo.

Después de analizar nuestra matriz de datos con el programa Model-Test 3.0.6 (Posada & Crandall, 1998) y eliminando del análisis el grupo externo, el modelo de evolución molecular al que mejor se ajustan nuestros datos siguiendo el test de probabilidad jerárquico o LRT es el de HKY+I+G (Hasegawa-Kishino-Yano 1985) con las siguientes frecuencias de las bases (A: 0,321; C: 0,288; G: 0,097; T:0,292) y un índice de Ti/Tv (Transición/Transversión) de 5,27. Este modelo asume que la tasa se sustitución entre nucleótidos no es homogénea, siguiendo una distribución gamma, con un parámetro a estimado de 0,2680 y que la proporción de sitios invariables es de 0,5. El segundo test que incorpora el programa, el llamado Criterio de Información de Akaike, AIC, elige como mejor modelo el TVM+I+G, que asume igualdad en las frecuencias de las bases, diferencias en las tasas Ti/Tv, una proporción de sitios invariables de 0,4994 y un parámetro α: 1,9782.

También llevamos a cabo otro análisis considerando sólo las poblaciones ibéricas de *Salamandra salamandra*. El modelo elegido por el LRT fue el mismo que en caso anterior, con los siguientes parámetros calculados: A: 0,2924; C: 0,2375; G: 0,1247; T: 0,3454; Ti/Tv: 4,9195 y α: 0,4112. El test de AIC dio como resultado el modelo GTR+G, estimando un parámetro α: 0,552.

Todos los modelos sugeridos incorporan en sus formulaciones varios parámetros (como las frecuencias de las bases, el índice Ti/Tv o los parámetros α e I) con la intención de corregir el posible sesgo provocado por estos factores sobre cualquier cálculo de distancia que hagamos que asuma la uniformidad de frecuencias o cambios entre posiciones o nucleótidos (las distancias sin corregir "p", por ejemplo). El problema es que al añadir más parámetros en el cálculo se incrementa la varianza del estadístico, por lo que necesitaremos un número muy elevado de nucleótidos para que las correcciones introducidas queden reflejadas en el resultado final (Nei & Kumar, 2000). Al trabajar con secuencias relativamente cortas como es nuestro caso, es posible que la utilización de modelos de mayor complejidad distorsionen de alguna manera los resultados, con lo que es preferible manejar modelos más sencillos, aunque corramos el riesgo de subestimar la diferenciación entre taxones. Por eso, decidimos calcular tanto las distancias "p" sin corregir, como las distancias HKY que incorporan la corrección para el sesgo en la tasa Ti/Tv y las distancias HKY+I+G, que incorporan además una tasa de distribución de nucleótidos heterogénea con distribución gamma, así como la proporción de sitios invariables. En el Apéndice II, mostramos las tablas de las tres distancias ("p", HKY y HKY+I+G) entre todas las secuencias. Como se puede observar, las distancias "p" son siempre menores a las otras dos, aunque guardan proporcionalidad con las HKY. Las distancias HKY+I+G son las que presentan más diferencias y éstas son más acusadas a medida que se incrementan los niveles de divergencia entre los taxones (no guardan por tanto proporcionalidad). De ahora en adelante utilizaremos en los análisis las distancias HKY, salvo que indiquemos lo contrario, como una medida de compromiso entre el sesgo de las distancias "p" que no incorporan ninguna corrección y el error introducido con un modelo demasiado complejo para el tamaño de nuestras secuencias como el HKY+I+G.

Las distancias entre el grupo externo y el interno varían entre 24,5% y el 27,6%. En el grupo interno, se encuentran divergencias desde el 26% entre géneros, hasta del 0% entre poblaciones de una misma subespecie de *Salamandra salamandra* o incluso entre algunas de sus subespecies. El grupo más divergente lo representa *M. caucasica*. Cabe destacar que la divergencia entre la dos especies tradicionalmente incluida en el género *Mertensiella*, *M. luschani* y *M. caucasica*, es relativamente alta, alcanzando valores del 25,4%.

Dentro del género *Salamandra*, la especie más diferenciada es *S. algira*, presentando unas distancias de entre 9,4% (con *S. lanzai*) a 12,2% (con *S. salamandra*). Ya dentro de la Península Ibérica, los porcentajes de divergencia varían entre el 0% y el 6,2%. Los mayores porcentajes (entre 4,5% y 6,2%) se encuentran al comparar cualquier subespecie de *S. salamandra* con alguna de las poblaciones de *S. s. longirostris*.

Hipótesis filogenéticas

Con el primer método de reconstrucción empleado, el "Neighbor-Joining" obtuvimos el árbol representado en la Fig. 4. Como se puede observar en la base del árbol, *M. caucasica* y *M. luschani* aparecen claramente separadas, haciendo de *Mertensiella* un género parafilético. *S. algira* aparece como la especie hermana del resto de especies europeas del género *Salamandra.* Dentro de las poblaciones ibéricas, el primer grupo que se diferencia con nitidez (valores de bootstrap –bs– del 90%) lo forman las poblaciones de *S. s. longirostris*, situadas al sur del Guadalquivir. El resto de poblaciones ibéricas forman un grupo más homogéneo, en el que, sin embargo, distinguimos cinco agrupaciones distintas. La primera (bs 85%) agrupa a todas las poblaciones de *S. s. crespoi* (bs 97%) y las poblaciones de *S. s. morenica* (bs 98%). En la segunda se agrupan las poblaciones incluidas dentro de la subespecie *almanzoris* (bs 93%). En el tercer grupo, están reunidas, aunque con un valor de bootstrap bajo (56%), las poblaciones de *S. s. bernardezi*, junto a un individuo de una población gallega (Trabada, *S. s. gallaica*), otros dos de una población ponferradina de *S. s. bejarae* (Río Oza) y otro de Cofiñal. Dentro del grupo de las *bernardezi* se diferencian dos subgrupos, separando las poblaciones del oeste asturiano (bs 72%) frente a las poblaciones del centro y del este (bs 73%). La última agrupación tiene una significación estadística baja (bs 57%) y la conforman el resto de individuos de *S. s. bejarae*, *S. s. gallaica*, *S. s. terrestris* y *S. s. bernardezi.* Dentro de esta agrupación sin definición sólo destacan dos agrupamientos: tres individuos *terrestris* aparecen unidos (bs 83%), así como dos individuos de Portugal (*S. s. gallaica*) junto a dos individuos adscritos a *S. s. bejarae* (bs 84%).

En segundo lugar, realizamos dos análisis de Máxima Parsimonia. En el primero no tuvimos en cuenta las diferencias en el número de transiciones y transversiones mientras que en el segundo sí nos atuvimos a este parámetro, estimando el peso de las transiciones frente a las transversiones en 5:1 para compensar esa diferencia. De los 372 caracteres, 166 contienen información filogenética. Con ellos se obtienen 532 árboles de 294 pasos cada uno (C. I: 0,517). El árbol consenso estricto está representado en la Fig. 5. Si incluimos en el análisis la matriz de pasos 5:1 se obtienen 1098 árboles de 598 pasos cada uno (C. I.: 0,560). El árbol consenso estricto tiene la misma topología que el anterior; la única diferencia es un ligero descenso en los índices de bootstrap. Como se puede observar, las relaciones entre las distintas poblaciones ibéricas de *Salamandra salamandra* son similares a las determinadas en el análisis de Neighbor-Joining, exceptuando el agrupamiento de las poblaciones gallegas de *S. s. gallaica* (junto a un individuo *bernardezi* del Pt. El Palo) y el agrupamiento de los dos clados que contienen poblaciones asturianas de *S. s. bernardezi* (aunque ambos con valores de bootstrap del 50%). En lo que se refiere a las relaciones interespecíficas, *M. caucasica* aparece ahora como grupo hermano del resto de las especies, mientras que la relación entre *Ch. lusitanica y M. luschani* no queda resuelta. De nuevo, el género *Mertensiella* aparece como un género parafilético.

Finalmente, llevamos a cabo un análisis de "Máxima Verosimilitud" con una búsqueda heurística rápida con bootstrap (100 réplicas), especificando en el análisis el

Fig. 4: Árbol de Neighbor-Joining generado a partir de las distancias "HKY" entre las secuencias de ADN. Se indican en las ramas los valores de bootstrap superiores 50.

Fig. 5: Árbol consenso de los 532 árboles de 294 pasos generados tras el análisis de Máxima Parsimonia. Indicamos también los valores de bootstrap obtenidos.

Fig. 6: Análisis de Máxima Verosimilitud, empleando el modelo (HKY+I+G).

modelo obtenido con el Model-Test (HKY+I+G). Como resultado, obtuvimos el árbol representado en la Fig. 6. En este caso, *Ch. lusitanica* aparece como grupo hermano del resto de especies. La relación entre las poblaciones de *M. luschani* y *M. caucasica* no queda bien definida, como tampoco lo están las relaciones entre *S. lanzai*, *S. algira*, *S. atra* y las poblaciones de *S. salamandra*. Éstas ultimas se encuentran divididas en dos grandes grupos. El primero (bs 80%) reúne a la práctica totalidad de las poblaciones de *S. s. gallaica*, *S. s. bejarae* y *S. s. terrestris*, exceptuando un individuo *gallaica* de Trabada además de los individuos *bejarae* del Río Oza. En este grupo también están incluidos dos individuos *bernardezi* (Pto. Del Palo e Isoba). Dentro del segundo grupo aparecen agrupadas poblaciones de *S. s. longirostris* (bs 100%), las poblaciones de *S. s. almanzoris* (bs 90%), las poblaciones de *S. s. morenica* (bs 90%) y las poblaciones de *S. s. crespoi* (bs 70%). Las poblaciones de *S. s. bernardezi* aparecen reunidas en varios grupos diferentes. En uno, (bs 100%) están las poblaciones más occidentales junto a un individuo *gallaica* de Trabada. En otro se juntan los individuos de Oviedo, El Fito y un individuo de Luarca. El otro individuo de esta población se agrupa con los individuos *bejarae* del Río Oza.

También realizamos un análisis "bayesiano" utilizando el mismo modelo que en el caso anterior. Como se puede observar (Fig. 7), las relaciones entre géneros y entre las diferente especies de *Salamandra* no quedan bien resueltas en este análisis. Sin embargo, dentro de las poblaciones ibéricas de *Salamandra salamandra* las probabilidades *a posteriori* calculadas para los distintos clados que, a semejanza de los índices de bootstrap, reflejan la robustez de cada grupo, presentan por lo general unos valores más elevados que en los análisis anteriores. Se observan seis agrupaciones que comprenden las poblaciones de *S. s. longirostris* (100%), las poblaciones de *S. s. morenica* (96%), las poblaciones de *S. s. crespoi* (91%), las poblaciones de *S. s. almanzoris* (91%), más dos grandes grupos, uno conteniendo las poblaciones de *S. s. bernardezi* (84%) junto con algún individuo de *S. s. gallaica* y *S. s. bejarae* y otro (89%) conteniendo el resto de poblaciones *gallaica* y *bejarae* junto a las poblaciones de *S. s. terrestris* y algún individuo *bernardezi*. A diferencia del resto de análisis, las poblaciones de *S. s. longirostris* no aparecen como el grupo hermano del resto de poblaciones ibéricas. Asimismo, los dos grupos de poblaciones de *S. s. bernardezi* que aparecen separados en el análisis de distancia con "Neighbor-Joining" aquí aparecen juntos en un mismo clado (88%), como también se agrupan (88%) todos los individuos gallegos de *S. s. gallaica* (con la excepción de un individuo de Trabada).

Análisis filogeográfico

En la Fig. 8 está representada la red de haplotipos generada por parsimonia (límite de confianza de parsimonia establecido en 8 pasos) con el programa TCS 1.13. Las 78 secuencias incluidas en el análisis (sólo se consideran las secuencias de *Salamandra salamandra*) se agrupan en 29 haplotipos. En la Tabla 2 hemos señalado la localización geográfica de los individuos incluidos en cada haplotipo. Algunos haplotipos (ej. X) reúnen individuos de localidades geográficas distintas o pertenecientes incluso a subespecies diferentes (ej. XI). Lo primero que destaca al analizar la red generada es que hay dos haplotipos que caen fuera del límite de confianza y que por tanto no están incluidos en la red. Son los haplotipos XXX y

Fig. 7: Análisis "bayesiano" empleando de nuevo el modelo (HKY+I+G). Indicamos en las ramas las probabilidades *a posteriori* calculadas para cada nodo.

Tabla 2: Relación de los individuos de cada población incluidos en cada haplotipo en el análisis de Clados Encajados. haplotipos como en VI o el XI incluyen individuos de distintas poblaciones y con diferentes estrategias reproductoras.

Haplotipo	Localidad	Individuos	Vivip S/N
I	Fonsagrada	1	N
II	Pto. Padornelo	1	N
III	Pto. del Palo	1	S
IV	Lugo	2	N
	Trabada	2	N
V	Palacios del Sil	2	N
VI	Arguenos	3	N
	Benasque	2	N
	Lanz	2	S
	Lindux	2	S
VII	Mijares	2	N
	San Pablo	1	N
VIII	S. Estrella	1	N
IX	Isoba	3	S/N
	Emb. Porma	2	N
	Lillo del Bierzo	2	N
X	Montseny	1	N
	Gresignes	1	N
	Setcasses	1	N
XI	Ucieda	4	S
	Lillo del Bierzo	1	N
	Pto. del Escudo	1	N
XII	San Mamede	1	N
	Sintra	1	N
XIII	Cabezuela-Hervás	2	N
XIV	Pto. del Palo	1	S
XV	Circo de Gredos	1	N
	Cinco Lagunas	1	N
	Peñalara	1	N
	Los Pájaros	1	N
	El Hornillo	1	N
XVI	El Fito	1	S
XVII	Luarca	1	S
XVIII	Luarca	1	S
XIX	Oviedo	4	S
XX	Cofiñal	1	N
XXI	Trabada	1	N
XXII	Amieva	1	S
XXIII	Amieva	2	S
XXIV	Río Oza	1	N
XXV	Río Oza	1	N
XXVI	Monast. Hermo	3	S
	Villablinos	1	S
	Pto. del Palo	1	S
XXVII	Monchique	2	N
	Santiago do Cacem	1	N
XXVIII	Sierra Morena	1	N
XXIX	Aracena	1	N
	Riópar	2	N
	Baños de la Encina	1	N
XXX	S. Grazalema	2	N
XXXI	S. Ronda	1	N

Fig. 8: Red de haplotipos generada con el programa TCS 1.13. Los haplotipos XXX y XXXI (poblaciones de *S. s. longirostris*) quedan fuera de la red.

XXXI, que se corresponden con las poblaciones de las Sierras de Ronda y Grazalema (*S. s. longitostris*). También se constata la presencia de fenómenos de reticulación. En la Fig. 9 mostramos el resultado del análisis encajado de la red. Los haplotipos pueden ser agrupados en 26 clados de 1-paso, 10 clados de 2-pasos y 4 clados de 3-pasos.

En la Fig. 10 se resumen los resultados del análisis estadístico llevado a cabo sobre las distancias calculadas. Como se puede observar, cada distancia puede ser significativamente alta o baja (L y S, respectivamente). A partir de las distancias significativamente altas o bajas y siguiendo la clave dicotómica propuesta por Templeton (1995) y modificada por Posada *et al.* (2000), se puede plantear hipótesis que reflejen los procesos históricos y poblacionales que han moldeado la estructura genética observada en la actualidad. En la Tabla 3, se resume las inferencias desgranadas a partir de la clave dicotómica. Aunque a niveles de encajamiento inferiores las posibles interpretaciones filogeográficas son más difíciles, a medida que aumentamos el nivel de encajamiento y, por ende, aumenta la variabilidad tanto geográfica como genética dentro de los grupos, el poder resolutivo del análisis es mayor.

De este análisis filogeográfico, destaca la existencia de cinco linajes o clados mitocondriales distintos, que han seguido una evolución independiente. Si analizamos la distribución geográfica de estos cinco clados mitocondriales (Fig. 11), podemos observar claramente que no se corresponde con la distribución de ninguna de las unidades taxo-

Fig. 9: Análisis de Clados Encajados (Nested Clade Analysis). En azul, clados de un paso; en rosa, clados de dos pasos; en verde, clados de tres pasos.

nómicas reconocida en la actualidad en la península, exceptuando a los haplotipos del sur del Guadalquivir que se corresponden con *S. s. longirostris*. En la Fig. 12, hemos ampliado la zona de la cornisa cantábrica, para poder ver en detalle la localización de las poblaciones, la distribución de las subespecies y los clados mitocondriales. Destaca la presencia

Tabla 3: Procesos inferidos a partir de las claves dicotómicas de Templeton (1995) y Posada *et al*. (2000).

Clado	*Cadena de Inferencia*	*Inferencia*
Haplotipos encajados en 1-2	1-2-3-5-15-16-18-NO	No se puede discriminar entre fragmentación, expansión y aislamiento por la distancia.
Haplotipos encajados en 1-3	1-2-11-17-4-9-10-NO	No se puede discriminar entre fragmentación y aislamiento por la distancia.
Haplotipos encajados en 1-16	1-2-11-17-4-9-10-SÍ	Fragmentación en alopatría
Clados de 1 paso encajados en 2-2	1-2-3-5-15-NO	Fragmentación antigua
Clados de 2 pasos encajados en 3-1	1-2-3-4-9-NO	Fragmentación antigua
Clados de 2 pasos encajados en 3-2	1-2-5-6-13-14-NO	No se puede discriminar entre expansión continua y colonización de larga distancia
Clados de 2 pasos encajados en 3-3	1-2-11-12-13-SÍ	Colonización de larga distancia
Clados de 2 pasos encajados en 3-4	1-2-11-12-NO	Expansión continua
Cladograma Total	1-2-3-4-9-NO	Fragmentación antigua

Fig. 10: Análisis estadístico de la relación entre la distribución de los haplotipos y clados y la localización geográfica de los individuos. **Dc**: distancia de clado; **Dn**: distancia encajada; **I-T**: distancia entre los clados situados en los extremos de la red y los clados interiores. En negrita se señalan las distancias significativamente altas (**L**) o significativamente pequeñas (**S**).

Fig. 11: Distribución de los individuos contenidos en los clados mitocondriales de 3 pasos en la Península Ibérica.

Fig. 12: Detalle de la Cornisa Cantábrica. En negro y verde hemos señalado las poblaciones mixtas y con individuos híbridos.

Fig. 13: Distribución del viviparismo y de los clados mitocondriales. Como se puede observar, el viviparismo se distribuye por tres linajes mitocondriales diferentes.

de dos clados diferenciados dentro de *S. s. bernardezi*. Asimismo, hemos destacado en la figura (en color verde) las poblaciones consideradas híbridas, poblaciones en las que se encuentran individuos con una morfología característica de una determinada subespecie pero con un mitocondrial propio de otra subespecie diferente (Trabada en Galicia o el Puerto del Palo en Asturias), o poblaciones en las que se encuentran individuos con mitocondriales pertenecientes a clados diferentes (Isoba). En la Fig. 13 hemos comparado la distribución del viviparismo con la de los linajes mitocondriales. Como se puede observar, éste se distribuye por tres de los cinco clados obtenidos en el análisis.

4. Electroforesis de aloenzimas

La técnica de la electroforesis de proteínas se empezó a utilizar extensamente en los años 60, y durante esa década y la siguiente supuso un impulso para todos los estudios referentes a genética de poblaciones, taxonomía o sistemática.

El principio de esta técnica es relativamente sencilla (PASTEUR *et al.*, 1987; MURPHY *et al.*, 1996). La composición en aminoácidos de una proteína determina su carga neta en disolución. Bajo la acción de un campo eléctrico, las proteínas se moverán y separarán dependiendo de esta carga. Basta con colocar muestras de proteínas solubles en un soporte sobre el que se pueda aplicar un campo eléctrico (geles de agarosa, almidón, poliacrilamida o acetatos de celulosa) y posteriormente teñir diferencialmente las proteínas para localizarlas en los geles. Al poner a migrar simultáneamente en el gel muestras de individuos de una misma población, especie o de diferentes especies, podremos visualizar y comparar las diferentes movilidades de cada proteína para cada individuo.

Los cambios en movilidad bajo un campo eléctrico representan cambios en la composición de aminoácidos de una proteína. Dado que cada aminoácido viene determinado en la cadena de ADN por un triplete de bases (o codón) diferente, al revelar las diferencias en movilidad estamos revelando de una forma indirecta cambios en la secuencia de ADN que codifica la proteína que estamos estudiando. Las bandas que observamos, consecuencia de la migración diferencial de las proteínas, son consideradas alelos diferentes de un mismo gen (aloenzimas) con una segregación mendeliana. Intentamos estudiar el máximo número posible de enzimas para cada individuo, lo que supone analizar la variabilidad de muchos genes, o, lo que es lo mismo, una estimación de variabilidad genética. Dado que en un mismo gel se puede estudiar simultáneamente entre 25 y 30 individuos, la electroforesis de proteínas es un método que permite comparar fácilmente la variabilidad de un alto número de genes ya sea entre individuos de una misma población, de diferentes poblaciones o de diferentes especies.

4.1 Metodología

Aplicaciones y limitaciones de la técnica

La técnica de la electroforesis de aloenzimas tiene múltiples aplicaciones siempre que tengamos presente sus limitaciones, así como los supuestos en los que se basa la interpretación de sus resultados (AVISE, 1994; MURPHY *et al.*, 1996).

La primera limitación técnica viene dada por la imposibilidad de analizar electroforéticamente proteínas no solubles; se infiere por tanto la variabilidad de un individuo a partir de una muestra reducida de su genoma (aunque éste es un problema general de todas las técnicas moleculares). Asimismo, al analizar los datos, asociamos la movilidad de un alelo a una secuencia de nucleótidos, y las variaciones en movilidad a variaciones en la secuencia de ADN. Sin embargo, muchas de las sustituciones de aminoácidos, al no implicar cambios en la carga neta de la proteína, no van a ser reveladas con este método, con lo que se estaría subestimando la variabilidad genética. Por otra parte, si el número de cambios entre dos individuos o especies es muy elevado, las estimaciones de la variabilidad también estarán seguramente infravaloradas ya que se habrán producido con seguridad sustituciones nucleotídicas o de aminoácidos en una misma posición, que tampoco van a poder ser valoradas (fenómeno de saturación).

El estudio de la variación de las frecuencias alélicas permite analizar la estructura genética de las poblaciones, los niveles de flujo genético y de migración. Una de las premisas claves al utilizar los datos es considerar todos los alelos de una misma enzima selectivamente iguales o neutros. Asimismo, la electroforesis es un método excelente para estudiar la cohesión reproductora entre poblaciones a través de marcadores alélicos. La fijación de diferentes variantes alélicas en distintas poblaciones indica la ausencia de reproducción entre ambas.

La electroforesis de aloenzimas ha sido muy utilizada también para la determinación de relaciones evolutivas entre especies, ya sea por métodos cuantitativos (de distancias, fenéticos) o cualitativos (utilizando estados de caracteres). En el primer caso, se calculan las distancias genéticas entre los grupos estudiados a partir de sus diferencias en frecuencias alélicas. Asumiendo una relativa constancia en los ritmos de evolución de las proteínas entre los grupos podemos determinar los tiempos relativos de divergencia entre ellos y por tanto cuáles se suponen más cercanos evolutivamente. En el segundo caso, empleamos estados de caracteres, ya sean presencia/ausencia de alelos o genotipos presentes, para determinar las relaciones filogenéticas entre los grupos. Esto implica asumir la homología de los alelos (tanto de su presencia como de su ausencia), hecho este bastante controvertido. Además, la propiedad observable que distingue a los alelos, esto es, su movilidad, no es suficientemente válida para determinar la dirección o polaridad de los cambios entre alelos.

En la actualidad se han desarrollado numerosas técnicas moleculares con un poder de resolución mayor ya que valoran directamente la variación de la secuencia de ADN deseada (RFLP, AFLP, microsatélites, secuenciación). Sin embargo, y a pesar de sus limitaciones, la electroforesis de aloenzimas sigue siendo una técnica válida y eficaz que permite analizar simultáneamente la variabilidad en muchos individuos de un número elevado de genes, con resultados fácilmente comparables y a un bajo coste relativo.

Desarrollo de la técnica

Utilizamos la electroforesis de aloenzimas para el análisis de la variabilidad genética de *Salamandra salamandra* dentro de la Península Ibérica. Las salamandras capturadas en los diferentes muestreos fueron disecadas en el laboratorio previa anestesia. Se cogieron muestras de hígado, corazón y músculo, que fueron inmediatamente congeladas (-70 ºC). Posteriormente estas muestras se homogeneizaron en un volumen igual de solución tampón Tris-EDTA (0,1 M Tris, 10^{-3} M EDTA, 5 x 10^{-5} M NADPH, ajustado a pH 6,8 con HCl). Después de centrifugar el homogeneizado (10' a 14 x 10^3 rpm) se retiró y guardó a -70ºC el sobrenadante.

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de almidón al 12%, utilizando cinco sistemas tampón diferentes: Tris-citrato pH 6,7 (TC-6,7), tris-citrato pH 8 (TC-8), tris-maleato-EDTA pH 6,9 (TME 6,9), tris-litio-citrato-borato a pH 8,3 (LiOH) y tris-citrato borato pH 8,7 (Poulik) (Tabla 4). Para visualizar todos los sistemas enzimáticos en los geles se usaron las tinciones descritas por Harris & Hopkins (1976) y Pasteur *et al.* (1987).

Tabla 4: Sistemas enzimáticos analizados en el estudio.

SISTEMA ENZIMATICO	*ABREV.*	*E.C.*	*SIST. TAMPON*
Aspartato amino transferasa	AAT	2.6.1.1	Poulik y TC 6,7
Aconitasa hidratasa	ACO	4.2.1.3	TME 6,9
Adenilato quinasa	AK	2.7.4.3	TC 6,7
Creatín-quinasa	CK	2.7.3.2	TC 6,7
Esterasas	EST	3.1.1.*	TME 6,9
Fructo-quinasa	FK	3.7.1.4	TC 6,7
Fumarasa	FUM	4.2.1.2	TME 6,9
Glucosa deshidrogenasa	GCDH	1.1.1.47	TC 8
Glutamato deshidrogenasa	GLD	1.4.1.2	TC 8
a-Glicerofosfato deshidrogenasa	G3PDH	1.1.1.8	Poulik
Glucosafosfato isomerasa	GPI	5.3.1.9	TC 6,7 y LiOH
Hexoquinasa	HK	2.7.1.1	TC 8
Isocitrato deshidrogenasa	IDH	1.1.1.42	TC 8
Leucín-amín-peptidasa	LAP	3.4.1.1	TC 8
Lactato deshidrogenasa	LDH	1.1.1.27	TC 6,7
Malato deshidrogenasa	MDH	1.1.1.37	TC 6,7
Malato deshidrogenasa NADP+ depen.	MDHP	1.1.1.40	TC 8
Manosafosfato isomerasa	MPI	5.3.1.8	TC 8
Peptidasas	PEP	3.4.13.*	TC 8
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	PGDH	1.1.1.44	TC 8
Fosfoglucomutasa	PGM	2.7.5.1	TC 6,7
Piruvato quinasa	PK	2.7.1.40	TC 6,7
Sorbitol deshidrogenasa	SDH	1.1.1.14	TC 8
Superóxido dismutasa	SOD	1.15.1.1	LIOH
Xantín deshidrogenasa	XDH	1.1.1.204	TC 6,7

Se anotaron los patrones de bandas de cada individuo para cada enzima. Los alelos se designaron alfabéticamente y en orden, siendo a el alelo que migraba más rápidamente hacia el polo positivo. Los patrones fenotípicos observados se tradujeron entonces a genotipos, que fueron los utilizados en los análisis siguientes.

Parámetros de variabilidad

En primer lugar, se calcularon para cada población con el programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989) y GDA 1.1 (Lewis & Zaykin, 2001) los siguientes parámetros: las frecuencia alélicas, el número medio de alelos por locus (A), el porcentaje de loci polimórficos (P), el número medio de alelos por locus polimórfico (Ap) y las heterocigosidades observadas y esperadas (Ho y He).

Asimismo hicimos una estimación de cómo se distribuye la variabilidad genética observada a través de los Estadísticos F de Wright (1943; 1978). Estos estadísticos (F_{IS}, F_{ST} y F_{IT}) analizan básicamente la distribución de heterocigotos dentro y entre poblaciones:

- F_{IS}: es el llamado coeficiente de endogamia. Mide la reducción (o incremento) de la heterocigosis en los individuos de una subpoblación causada por la tendencia a que se den cruces entre individuos emparentados.

- F_{ST}: mide la reducción (o el incremento) de la heterocigosis de las subpoblaciones debida a la fijación diferencial de alelos por deriva génica. Es el coeficiente de fijación. Es siempre superior a 0, salvo si todas las poblaciones se encuentran en equi-

librio y con las mismas frecuencias alélicas, en cuyo caso sería igual a 0. Refleja el grado de fragmentación genética de un conjunto de poblaciones.

- F_{IT}: representa la reducción (o el incremento) de heterocigosis de los individuos en relación con la población total. La reducción total de heterocigotos incluye por una parte los fenómenos de endogamia en las subpoblaciones (F_{IS}) y los efectos de la propia subdivisión (F_{ST}) por otra.

De nuevo, los estadísticos F de Wright fueron calculados por medio del programa GDA 1.1. Realizamos un bootstrap (10.000 réplicas) de las frecuencias originales para determinar si los valores obtenidos de los estadísticos F de Wright eran significativamente diferentes de 0 (Intervalo de Confianza del 95%). Además, recalculamos cada coeficiente eliminando una población cada vez (proceso denominado "jacknifing"), para comprobar si alguna de ellas influía de una manera significativa en el exceso o en la falta de heterocigotos. Realizamos este mismo proceso con los diferentes loci. Asimismo calculamos cada coeficiente (realizando también un bootstrap con 10.000 réplicas) para cada grupo de poblaciones adscrito a alguna subespecie para comprobar si dentro de cada agrupación taxonómica existía un equilibrio en las frecuencias de los heterocigotos.

Por otra parte, las frecuencias alélicas pueden ser transformadas en coeficientes de distancias (o similitud) genética. Con esto se pretende simplificar el análisis de los datos al obtenerse un valor único para cada par de poblaciones, valor que puede ser comparado y relacionado fácilmente. Existen múltiples coeficientes diferentes, cada uno con propiedades distintas (Buth, 1984; Swofford & Olsen, 1996). Por medio de programa PHYLIP (Felsenstein, 1993) se calcularon 2 coeficientes de distancia diferentes:

Distancia de Nei corregida para tamaños muestrales pequeños (Nei, 1978): intenta reflejar una propiedad biológica, el número de cambios de codones que se han producido desde la separación de dos poblaciones. Para esto es necesario considerar que el ritmo de sustituciones entre loci y entre poblaciones es constante, lo que puede ser poco realista (Hillis, 1984). Tiene además otro problema añadido que es su falta de metricidad: al comparar las distancias entre tres taxones A, B y C, la distancia AC tiene que ser inferior o igual a las distancias AB más BC, por lo que a veces, al construir dendrogramas con ese coeficiente, se puede obtener valores negativos en algunas ramas, imposibilitándose su interpretación biológica. Además, este coeficiente de distancia comparte con otros coeficientes (como el de Rogers) otro problema: se ven bastante influenciados por el grado de heterocigosis de los taxones. Así, la distancia entre dos taxones con alelos diferentes y fijados será mayor que la distancia entre dos taxones que tampoco compartan ningún alelo pero que presenten varios alelos por loci. A pesar de estos problemas, la distancia genética de Nei es el coeficiente más ampliamente utilizado, teniendo por tanto un valor comparativo muy importante.

Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$DN = \ln \left(J_{XY} / \sqrt{J_X J_Y} \right),$$

siendo x e y las frecuencias de un determinado alelo en las poblaciones X e Y respectivamente, y J_X, J_Y, J_{XY}, las medias aritméticas entre todos los loci de $\sum x^2$, $\sum y^2$, $\sum xy$ respectivamente. La distancia corregida para tamaños muestrales (n) pequeños se obtiene remplazando $\sum x^2$, $\sum y^2$ por $(2n\sum x^2-1)$ y $(2n\sum y^2-1)$.

Distancia de cuerda de CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967): el segundo coeficiente calculado resuelve, por su formulación, los problemas anteriores. Además, incorpora algunas propiedades biológicas. No considera ni mutación, ni selección, ni migración, pero sí la deriva genética en los procesos de diferenciación. Incorpora una transformación angular de las frecuencias alélicas con lo que consigue que la varianza entre los valores sea proporcional al tiempo de divergencia entre poblaciones (mientras que la media será constante en ausencia de selección direccional).

$$D_{arc} = \sqrt{(1/L) \bullet_L \left[2\left(\cos - 1 \bullet \sqrt{xiyi}\right) / \Pi \right]^2}$$

Por último, realizamos un test de Mantel (MANTEL, 1967) para analizar el grado de correlación entre distancias genéticas (Distancias de Nei) y distancias geográficas (Distancias en kilómetros). A través de este análisis, se pretende analizar los patrones de flujo génico entre las diferentes poblaciones y los procesos tanto históricos como poblacionales implicados (aislamiento por la distancia, expansiones, reticulaciones). Asimismo, se puede distinguir entre diferentes modelos evolutivos poblacionales como el aislamiento por la distancia. El test analiza el grado de correlación entre los valores de dos matrices de distancias (SMOUSE *et al.*, 1986; ROHLF, 1993). Calcula el parámetro (Z) a partir de la fórmula $Z = \sum(X_{ij}\ Y_{ij})$, (siendo X e Y dos matrices, y los pares ij los valores de las matrices) para las matrices introducidas. Posteriormente, permuta aleatoriamente las variables de una de las matrices (hasta 999 veces), recalculando cada vez el parámetro Z, para establecer la probabilidad de obtener por azar un valor de Z al menos tan alto como el obtenido con las matrices originales, dado que cuando existe la misma relación entre las variables de las dos matrices, Z alcanza su valor máximo. Asimismo, también se calcula el grado de correlación (r) entre las dos matrices. Se considera que existe una alta correlación cuando r es superior o igual a 0,9 (ROHLF, 1993). Por debajo de 0,7, esta correlación es muy baja o nula. El test de Mantel se realizó con el programa GenAlEx (PEAKALL & SMOUSE, 2001).

Reconstrucción filogenética

Los datos aloenzimáticos pueden ser tratados fundamentalmente de dos formas: mediante análisis cuantitativos o de distancia, y mediante análisis cualitativos, que comparan estados de caracteres.

Dentro de los métodos de distancia, decidimos utilizar tanto un método de agrupamiento ("cluster analysis") como un método aditivo ("additive tree") para analizar nuestros datos. En el primer caso, utilizamos el método del UPGMA. Construimos dos dendrogramas por medio del programa PHYLIP (Felsenstein, 1993): uno a partir de distancias de Nei y el otro a partir de la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards. Pretendíamos con esto comparar los dendrogramas obtenidos con coeficientes de distancia que tienen propiedades diferentes. En ambos casos realizamos un "bootstrap" (1000 réplicas) (Hillis & Bull, 1993) para comprobar los niveles estadísticos de significación de los dendrogramas obtenidos. Dentro de los métodos aditivos, optamos de nuevo por el método del "Vecino más Próximo" ("Neighbor-Joining"). De nuevo, usamos el programa PHYLIP para la construcción de un árbol de "Neighbor Joining" a partir de distancias de Nei (1978) y otro con distancias de cuerda de Cavalli-Esforza y Edwards (1967), realizando asimismo en ambos un bootstrap con 1000 réplicas.

La utilización de caracteres polimórficos (como las aloenzimas) en análisis cualitativos tiene una dificultad añadida a la hora de definir estados de carácter, ordenarlos y polarizarlos (Buth, 1984; Wiens, 1995). Se han propuesto múltiples procedimientos para trabajar con este tipo de datos (Berlocher & Swofford, 1997; Buth, 1984; Mabee & Humphries, 1993; Mardulyn & Pasteels, 1994; Murphy, 1993; Murphy & Doyle, 1998; Patton & Avise, 1983; Solé-Cava *et al.*, 1994; Swofford *et al.*, 1996; Swofford & Berlocher, 1987; Wiens, 1995; 1999; 2000). En concreto, y para las aloenzimas, la primera posibilidad es considerar cada alelo como un carácter binario que puede estar presente (1) o ausente (0) en cada población. Este método se conoce como el "modelo de alelos independientes" (Mickevich & Johnson, 1976). Aunque bastante utilizado, también ha sido criticado por varios motivos (Murphy, 1993 para una completa discusión de este método de codificación). En primer lugar, los alelos de un mismo locus no son realmente independientes. La presencia de uno condiciona directamente la de otro(s) ya que la suma de sus frecuencias tiene que ser igual a 1. Al considerarlos independientes, puede ocurrir que en las reconstrucciones filogenéticas, los taxones ancestrales hipotéticos no tengan ningún alelo (Mabee & Humphries, 1993). Además, se asume que la desaparición de un determinado alelo en diferentes individuos o poblaciones es un proceso homólogo, lo cual no tiene por qué ser así. Otra crítica importante es que la presencia o ausencia de un alelo está a veces demasiado condicionada por el tamaño muestral, por lo que es aconsejable desechar del análisis los alelos raros (con frecuencias inferiores a 0,05). Por todos estos inconvenientes, y a pesar de su amplia utilización, decidimos no llevar a cabo este tipo de análisis.

La segunda opción es considerar que el locus es la unidad susceptible de cambio o, lo que es lo mismo, el carácter. Las combinaciones alélicas en cada individuo o población representarán los diferentes estados del carácter. Los estados pueden no estar relacionados entre sí (no ordenados). En este caso, se considera que es posible el paso de un estado a cualquiera de los otros, con el mismo "coste" en número de pasos. Todos los estados tienen pues el mismo peso. El problema al considerarlos como no ordenados es que probablemente no contengan ninguna información filogenética válida. Nos

encontraríamos de nuevo realizando, según la argumentación cladista, un análisis numérico más que una reconstrucción filogenética (WÄGELE, 1994). Por el contrario, podemos considerar que los diferentes estados pueden estar ordenados, creando así unas series de transformación. Existen diferentes maneras de codificar estas series (MICKEVICH & MITTER, 1981; 1983; SOLE-CAVA *et al.*, 1994; MABEE & HUMPHRIES, 1993; MARDULYN & PASTEELS, 1994). En nuestro caso, utilizamos el método propuesto por MURPHY (1993) y MURPHY & DOYLE (1998) denominado "Mutation Coding", que consideramos el método biológica y metodológicamente más coherente. Siguiendo este método de codificación, las sinapomorfías se definen como mutaciones en un locus común ancestral. La presencia de un carácter derivado, sea cual sea su frecuencia, se considera filogenéticamente informativa. Las mutaciones hipotéticas son por tanto los procesos claves a la hora de agrupar taxones. En este tipo de análisis, sólo consideramos la ganancia de alelos como informativa. La pérdida de alelos en un locus determinado es, o potencialmente puede ser, un proceso altamente homoplásico, por lo que no se incluye en el análisis (peso igual a cero) a diferencia de otros métodos de codificación como los propuestos por MABEE & HUMPHRIES (1993) y MARDULYN & PASTEELS (1994).

Una tercera posibilidad es considerar directamente las frecuencias alélicas como estados de carácter dentro del análisis filogenético, recuperando así una información que se pierde en los otros métodos de codificación (ROGERS, 1984; 1986; BERLOCHER & SWOFFORD, 1997; SWOFFORD & BERLOCHER, 1987). Los algoritmos de frecuencia tienden a minimizar el cambio en frecuencias entre todos los loci en cada nodo de la reconstrucción (con la única restricción de que las frecuencias de los alelos en cada locus siempre sumen uno). Una crítica que se suele hacer a este método es que las frecuencias en sí no son heredables y son fácilmente modificables por procesos como la deriva génica, la selección o el flujo génico, con lo que perderían toda señal filogenética. Además, como MURPHY & DOYLE (1998) apuntan, se ignora en este tipo de análisis la condición plesiomórfica o apomórfica de los estados de carácter (i.e las frecuencias), lo que constituye de nuevo una "violación" de la metodología cladista. Aún así, decidimos realizar también este tipo de análisis para compararlo con los anteriormente obtenidos. Para ello seguimos el procedimiento descrito por BERLOCHER & SWOFFORD (1997) que consiste básicamente en calcular para cada locus polimórfico una matriz de distancias de Manhattan entre todos los pares de poblaciones. Esta matriz es utilizada entonces como una "matriz de pasos" (step matrix) entre estados de carácter en la reconstrucción filogenética.

Para los análisis cualitativos utilizamos de nuevo los programas PAUP* 4.0b10 ("Phylogenetic Analysis Using Parsimony") (SWOFFORD, 2000) y MacClade 3.08a (MADDISON & MADDISON, 1992). El criterio de optimación de las reconstrucciones es en este caso la parsimonia, esto es, la búsqueda de la solución más sencilla. El árbol más parsimonioso es aquel que requiere el menor número de pasos o cambios entre estados para explicar las diferencias observadas entre taxones. PAUP* 4.0b10 presenta varios algoritmos de búsqueda, exhaustivos o heurísticos. Nosotros utilizamos en todos los análisis el método heurístico eligiendo la opción de adición aleatoria de los taxones" ("random stepwise addition") con 10 réplicas y con una posterior optimación de las topologías

Tabla 5: Relación de alelos raros, alelos exclusivos y alelos marcadores en las poblaciones estudiadas.

	Alelos Raros		Alelos Exclusivos		Alelos Marcadores	
POBLACIÓN	LOCUS	ALELO	LOCUS	ALELO	LOCUS	ALELO
Arguenos			Pgm-1	a		
Godán			Ak-2	b		
Gredos	Ldh-2	c				
		d				
	Pgm-1	c				
		d				
		f				
Guadalupe			Icd-1	c		
Losar	Gpi-1	b				
	Ldh-2	c				
		d				
	Pgm-1	b				
Mijares	Mdh-2	f				
Oviedo	Lap-1	a	Fum-1	a		
	Mdh-2	b				
	Mpi-1	c				
	Sod-2	a				
Pto. El Palo	Est-M	e				
	Gdh-1	b				
		e				
	Gpi-1	d				
	Me-1	b				
	Mpi-1	c				
Pto.S. Isidro	Hkm-1	c				
	Xdh-1	a				
Riópar	Icd-2	a				
	Mdh-2	g				
San Vicente			Aco-1	a		
S. Estrela	Gdh-1	b				
	Mdh-2	f				
Sintra	Aat-2	d				
	Ck-1	c				
	Gpi-1	d				
Trabada	Mdh-2	b				
M. Hermo	Ldh-2	b				
	Pep-1	c				
	Sdh-1	a				
Ucieda			Gpi-1	a		
Turquía			Aat-1	b	Ck-1	a
			Ldh-2	f	Sod-2	b
				g		
				h		
			Mdh-2	a		
			Me-1	e		
			Mpi-1	d		
			Pgd-1	c		

Tabla 6: Parámetros de variabilidad genética estimados. "**n**": número de individuos; "**P**": porcentaje de loci polimórficos por población; "**A**": número medio de alelos por locus; "**Ap**": número medio de alelos por locus polimórfico; "**He**": heterocigosidad esperada; "**Ho**": herteocigosidad observada; "**f**": índice de fijación o de endogamia.

Población	n	P	A	Ap	He	Ho	f
ARGUENOS	9,97	30%	1,37	2,22	0,096	0,063	0,355
AMIEVA	9,40	53%	1,67	2,25	0,199	0,084	0,592
ARACENA	6,80	47%	1,50	2,07	0,161	0,117	0,296
ARANCEDO	9,57	43%	1,60	2,38	0,171	0,078	0,559
BENASQUE	5,97	33%	1,47	2,40	0,149	0,056	0,648
CABEZUELA	9,87	27%	1,37	2,38	0,095	0,089	0,066
CINCO LAGUNAS	5,00	17%	1,17	2,00	0,053	0,020	0,647
COVADONGA	9,97	37%	1,37	2,00	0,124	0,066	0,487
ESTRELLA	14,57	50%	1,57	2,13	0,159	0,092	0,426
FITO	10,00	37%	1,43	2,18	0,152	0,127	0,172
FONSAGRADA	9,83	37%	1,43	2,18	0,127	0,070	0,459
GODÁN	7,87	40%	1,43	2,08	0,164	0,085	0,501
GREDOS	15,30	27%	1,43	2,63	0,070	0,044	0,385
GRESIGNE	3,80	23%	1,27	2,14	0,121	0,058	0,569
GUADALUPE	9,43	47%	1,47	2,00	0,118	0,066	0,455
HORNILLO	9,97	23%	1,23	2,00	0,045	0,044	0,031
LANZ	4,73	37%	1,60	2,64	0,190	0,112	0,445
LILLO DEL BIERZO	7,90	33%	1,40	2,20	0,121	0,071	0,429
LINDUS	9,97	47%	1,73	2,57	0,170	0,096	0,452
LOS PÁJAROS	7,00	20%	1,23	2,17	0,052	0,029	0,471
LOSAR	10,37	40%	1,60	2,50	0,128	0,066	0,498
LUARCA	1,93	23%	1,23	2,00	0,133	0,067	0,600
LUGO	7,97	47%	1,67	2,43	0,192	0,098	0,503
MIJARES	10,43	40%	1,50	2,25	0,095	0,052	0,469
MONAST. HERMO	10,30	40%	1,60	2,50	0,186	0,107	0,436
MONCHIQUE	10,00	43%	1,53	2,23	0,143	0,133	0,072
MONTES	4,97	20%	1,23	2,17	0,097	0,060	0,410
MONTSENY	9,97	27%	1,40	2,50	0,093	0,060	0,365
OSCOS	9,83	43%	1,50	2,15	0,143	0,075	0,493
OVIEDO	17,80	57%	1,87	2,53	0,197	0,125	0,371
PEÑALARA	10,00	20%	1,20	2,00	0,061	0,053	0,138
PONTEVEDRA	8,00	30%	1,37	2,22	0,119	0,075	0,385
PTO. PALO	17,73	53%	1,80	2,50	0,183	0,075	0,600
PTO.SAN ISIDRO	10,53	60%	1,83	2,39	0,258	0,161	0,389
RÍO OZA	7,57	47%	1,67	2,43	0,172	0,091	0,493
RIÓPAR	12,13	37%	1,40	2,09	0,105	0,046	0,568
RONDA	6,00	30%	1,30	2,00	0,078	0,078	0,000
SAN VINCENTE	9,97	23%	1,23	2,00	0,034	0,023	0,330
SAN MAMEDE	9,97	37%	1,47	2,27	0,099	0,081	0,182
SANTIAGO	2,00	10%	1,13	2,33	0,067	0,033	0,600
SANTIBÁÑEZ	3,80	23%	1,23	2,00	0,092	0,067	0,296
SINTRA	13,13	40%	1,50	2,25	0,125	0,077	0,392
TRABADA	10,70	57%	1,80	2,41	0,213	0,086	0,608
UCIEDA	9,77	47%	1,67	2,43	0,197	0,099	0,510
VILLABLINOS	2,73	37%	1,37	2,00	0,217	0,117	0,630
Media	**8,99**	**36%**	**1,46**	**2,25**	**0,132**	**0,077**	**0,438**

obtenidas con la opción denominada "intercambio de ramas con TBR" ("Branch swapping with Tree Bisection-Reconnection").

4.2 Resultados

Analizamos la variabilidad de 30 loci en 426 individuos muestreados en 46 poblaciones ibéricas de *Salamandra salamandra*, además de una población turca de *Mertensiella luschani*, utilizada como grupo externo en los análisis filogenéticos. Detectamos un total de 112 alelos. Dependiendo de la frecuencia y extensión con las que se encuentre un alelo se le puede denominar de distinta forma. Así llamaremos "alelo raro" a todo alelo que aparezca en una población con una frecuencia inferior a 0,05. Asimismo un "alelo marcador" será aquel que aparezca en una población con una frecuencia de 1 y no aparezca en el resto. Si aparece en una población (y no en el resto) pero acompañado de otras variantes alélicas y por tanto con una frecuencia inferior a 1 (y superior a 0,05) lo denominaremos "alelo exclusivo". En la siguiente tabla (Tabla 5), mostramos los diferentes alelos marcadores (M), alelos exclusivos (E) y alelos raros (R) encontrados en las 46 poblaciones de salamandras. Destaca el bajo número de alelos exclusivos (seis en las poblaciones ibéricas más ocho en la población turca) y el de alelos marcadores, sólo presentes en la población utilizada como grupo externo (Turquía).

En la Tabla 6, mostramos los índices de variabilidad analizados. El porcentaje de loci polimórficos varía entre un 10 % en Santiago do Cacem (población con sólo dos individuos) y el 60% del Puerto de San Isidro. En esta población están incluidos individuos que morfológicamente se pueden adscribir a *S. s. bejarae* y a *S. s. bernardezi* (individuos secuenciados de Isoba, Cofiñal y Embalse del Porma, reunidos aquí en una misma población por su proximidad geográfica - transepto de 10km-). El porcentaje medio de loci polimórficos es del 36%. El número medio de alelos tanto por locus (valor medio 1,46) como por locus polimórfico (valor medio 2,25) es homogéneo entre poblaciones.

Realizamos el análisis de los niveles de heterocigosis a través de los estadísticos F de Wright. Como podemos ver en la Tabla 7, los tres índices F_{is}, F_{st} y F_{it} son diferentes significativamente de 0 cuando consideramos el conjunto de poblaciones ibéricas. Además, ninguna población ni ningún locus contribuye significativamente más que otra u otro al desequilibrio de heterocigotos observado ("jacknifing") (datos no reflejados en

Tabla 7: Valores de los estadísticos de Wright obtenidos tras un bootstrap de 10.000 réplicas. Los tres son significativamente diferentes de cero.

	Fis	Fit	Fst
Valor medio	**0,428**	**0,689**	**0,456**
Lím. Superior	0,538	0,758	0,533
Lím. Inferior	0,324	0,616	0,372
Nº réplicas	10000	10000	10000
Confianza	95%	95%	95%

Tabla 8: Tabla de las distancias genéticas enter poblaciones: Debajo de la diagonal, Distancias de Nei (1978); encima de la diagonal, distancias de Cavalli-Sforza y Edwards (1967).

Población	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
1 ARGUENOS	****	.338	.308	.367	.324	.193	.329	.278	.340	.331	.285	.312	.293	.347	.365	.430	.415	.333	.321	.408	.380	.401	.402	.392	.365	.339	.355	.336	.375	.426	.438	.400	.340	.385	.253	.602	.336	.354	.343	.376	.310	.363	.372	.356	.379	.348
2 FITO	.145	****	.296	.245	.248	.327	.221	.324	.220	.183	.245	.212	.259	.336	.371	.431	.312	.331	.306	.405	.380	.395	.404	.388	.355	.360	.347	.410	.358	.427	.411	.388	.372	.352	.392	.556	.256	.264	.349	.280	.322	.377	.208	.237	.324	.230
3 FONSAGRADA	.119	.104	****	.357	.324	.222	.285	.183	.325	.295	.273	.247	.167	.310	.353	.363	.333	.261	.275	.397	.348	.348	.360	.336	.354	.267	.337	.313	.340	.418	.402	.354	.340	.406	.350	.568	.321	.318	.271	.334	.268	.325	.351	.310	.339	.296
4 LANZ	.183	.058	.163	****	.170	.360	.301	.355	.258	.306	.311	.295	.336	.403	.426	.481	.399	.398	.368	.442	.431	.433	.446	.447	.418	.410	.422	.431	.431	.449	.491	.449	.424	.370	.436	.567	.333	.344	.365	.340	.395	.427	.302	.314	.385	.335
5 LINDUS	.174	.062	.160	.005	****	.314	.300	.330	.237	.285	.290	.272	.300	.365	.381	.440	.374	.368	.335	.417	.394	.405	.408	.412	.392	.376	.380	.390	.397	.425	.466	.422	.391	.345	.411	.591	.326	.332	.333	.331	.366	.384	.302	.303	.391	.327
6 MONTSENY	.037	.124	.057	.158	.151	****	.283	.179	.329	.306	.273	.264	.227	.324	.340	.405	.371	.293	.278	.377	.348	.365	.371	.381	.341	.306	.336	.315	.332	.394	.414	.357	.328	.385	.257	.571	.292	.304	.266	.332	.251	.296	.342	.313	.321	.304
7 OVIEDO	.122	.044	.085	.099	.123	.082	****	.297	.261	.227	.237	.184	.248	.352	.387	.439	.349	.327	.317	.410	.380	.382	.413	.401	.375	.338	.382	.407	.370	.431	.418	.386	.356	.396	.362	.541	.191	.191	.302	.205	.286	.328	.224	.237	.265	.246
8 PONTEVEDRA	.080	.126	.039	.143	.139	.027	.095	****	.325	.297	.265	.248	.199	.340	.368	.409	.379	.271	.305	.404	.375	.387	.386	.389	.364	.294	.321	.339	.352	.421	.419	.368	.348	.420	.315	.556	.300	.315	.233	.321	.242	.286	.346	.306	.318	.305
9 UCIEDA	.149	.051	.146	.063	.055	.139	.085	.142	****	.239	.254	.239	.300	.385	.420	.474	.380	.382	.368	.445	.416	.435	.441	.429	.377	.402	.394	.443	.420	.461	.474	.434	.404	.341	.400	.574	.282	.288	.345	.312	.372	.374	.246	.307	.374	.290
10 COVADONGA	.132	.024	.098	.101	.097	.105	.037	.110	.068	****	.254	.207	.261	.352	.353	.417	.354	.338	.337	.401	.372	.390	.401	.405	.368	.361	.325	.417	.352	.423	.420	.379	.347	.404	.386	.571	.222	.232	.345	.241	.306	.383	.221	.260	.327	.251
11 GODAN	.095	.048	.091	.099	.094	.082	.042	.081	.075	.059	****	.171	.184	.329	.381	.422	.343	.305	.294	.431	.384	.397	.407	.381	.343	.313	.325	.375	.387	.451	.449	.404	.365	.363	.372	.547	.230	.257	.305	.272	.299	.345	.265	.277	.338	.238
12 PALO	.113	.034	.061	.084	.082	.071	.026	.065	.059	.035	.017	****	.156	.335	.374	.419	.331	.310	.289	.422	.386	.372	.408	.383	.356	.308	.333	.391	.380	.443	.429	.385	.354	.370	.378	.541	.202	.205	.271	.215	.281	.304	.197	.214	.280	.209
13 OSCOS	.110	.070	.032	.118	.114	.057	.054	.041	.119	.072	.029	.019	****	.303	.355	.375	.332	.267	.244	.413	.363	.348	.382	.348	.334	.255	.305	.340	.360	.438	.412	.368	.337	.352	.354	.548	.257	.266	.264	.279	.265	.308	.286	.267	.298	.227
14 ARACENA	.141	.120	.152	.206	.191	.129	.131	.151	.185	.146	.113	.121	.127	****	.218	.297	.322	.244	.278	.404	.357	.357	.306	.240	.217	.209	.249	.255	.358	.416	.412	.368	.323	.401	.403	.571	.371	.383	.380	.382	.361	.392	.378	.354	.392	.338
15 CABEZUELA	.153	.178	.174	.248	.222	.142	.179	.160	.245	.164	.166	.171	.170	.036	****	.233	.330	.272	.289	.323	.281	.310	.251	.268	.276	.290	.224	.230	.282	.335	.353	.302	.287	.434	.399	.598	.378	.389	.401	.395	.364	.417	.403	.398	.416	.382
16 MONTES	.230	.243	.178	.323	.301	.206	.247	.216	.330	.238	.219	.226	.184	.092	.050	****	.379	.304	.322	.391	.322	.312	.290	.242	.330	.310	.297	.284	.344	.409	.388	.337	.337	.473	.474	.588	.433	.435	.443	.456	.412	.480	.457	.454	.468	.429
17 RONDA	.222	.104	.138	.193	.178	.171	.127	.165	.173	.142	.120	.107	.132	.118	.133	.176	****	.343	.257	.340	.294	.320	.346	.366	.342	.384	.363	.376	.283	.377	.356	.307	.335	.437	.456	.548	.359	.366	.374	.381	.345	.373	.368	.368	.382	.337
18 SINTRA	.130	.123	.091	.200	.188	.100	.120	.077	.198	.130	.090	.103	.084	.070	.079	.118	.135	****	.298	.397	.368	.366	.298	.292	.262	.185	.242	.247	.349	.418	.416	.366	.342	.454	.382	.574	.338	.359	.332	.371	.314	.370	.381	.345	.384	.347
19 MONCHIQUE	.121	.090	.088	.142	.138	.080	.078	.102	.161	.116	.066	.068	.057	.077	.101	.124	.074	.107	****	.349	.286	.283	.336	.329	.298	.297	.342	.306	.287	.379	.339	.301	.287	.357	.378	.535	.307	.325	.335	.360	.316	.343	.345	.343	.334	.298
20 PEYALARA	.212	.215	.217	.263	.241	.190	.210	.217	.284	.196	.214	.217	.229	.182	.124	.200	.154	.205	.143	****	.204	.255	.332	.410	.391	.432	.404	.363	.191	.102	.264	.200	.271	.466	.424	.603	.400	.419	.432	.418	.409	.443	.435	.449	.450	.432
21 GREDOS	.179	.175	.154	.247	.231	.157	.164	.173	.242	.159	.168	.168	.163	.143	.092	.133	.104	.166	.093	.043	****	.189	.300	.346	.360	.386	.359	.333	.147	.242	.211	.119	.222	.409	.401	.580	.358	.374	.387	.399	.364	.404	.405	.416	.414	.388
22 MIJARES	.202	.197	.142	.253	.247	.163	.170	.188	.269	.178	.179	.168	.143	.154	.114	.109	.136	.186	.085	.082	.023	****	.313	.343	.365	.354	.389	.345	.225	.293	.252	.167	.208	.421	.450	.577	.363	.380	.409	.393	.396	.430	.416	.434	.412	.405
23 LOSAR	.203	.217	.186	.292	.265	.175	.220	.191	.294	.207	.205	.215	.208	.091	.054	.096	.145	.101	.138	.136	.109	.128	****	.316	.329	.324	.323	.264	.295	.354	.370	.319	.333	.461	.414	.578	.409	.413	.414	.442	.388	.440	.444	.434	.458	.424
24 GUADALUPE	.208	.188	.181	.278	.261	.201	.212	.219	.259	.214	.180	.185	.174	.054	.062	.054	.153	.120	.121	.203	.143	.134	.114	****	.291	.281	.270	.247	.375	.422	.403	.360	.325	.441	.433	.592	.412	.425	.430	.444	.414	.454	.419	.427	.462	.382
25 RIOPAR	.169	.140	.192	.225	.210	.147	.158	.178	.187	.164	.126	.141	.150	.034	.087	.130	.138	.089	.106	.197	.170	.176	.124	.090	****	.294	.275	.317	.360	.409	.415	.366	.345	.412	.417	.566	.365	.379	.416	.399	.395	.430	.372	.393	.423	.328
26 ESTRELLA	.137	.156	.097	.222	.219	.118	.134	.110	.235	.166	.103	.123	.080	.047	.092	.099	.196	.044	.091	.245	.184	.161	.131	.096	.101	****	.284	.241	.388	.442	.433	.384	.335	.427	.402	.586	.354	.380	.315	.370	.337	.361	.388	.356	.358	.359
27 SANTIAGO	.140	.135	.158	.218	.191	.137	.164	.116	.192	.136	.111	.122	.111	.052	.050	.101	.148	.052	.141	.217	.167	.205	.118	.086	.081	.086	****	.295	.355	.416	.414	.369	.339	.439	.385	.581	.370	.382	.377	.396	.339	.416	.368	.361	.423	.321
28 SANTIBAYEZ	.131	.208	.141	.244	.225	.121	.197	.141	.279	.221	.162	.187	.159	.058	.035	.075	.176	.063	.102	.154	.132	.146	.073	.063	.116	.053	.091	****	.331	.373	.396	.349	.326	.453	.383	.606	.414	.431	.372	.449	.368	.400	.456	.430	.439	.426
29 CINCOLAGUNAS	.170	.147	.132	.233	.213	.131	.141	.141	.220	.133	.150	.148	.150	.128	.083	.142	.082	.134	.087	.046	.016	.042	.092	.153	.150	.180	.159	.127	****	.236	.193	.141	.237	.425	.386	.570	.349	.362	.380	.379	.327	.388	.397	.394	.393	.382
30 LOSPAJAROS	.234	.241	.245	.277	.256	.214	.237	.241	.310	.221	.240	.245	.258	.200	.138	.222	.186	.230	.169	.001	.061	.105	.156	.221	.221	.265	.235	.166	.069	****	.299	.235	.303	.486	.440	.620	.420	.440	.444	.439	.434	.464	.448	.465	.474	.447
31 SANVINCENTE	.247	.223	.201	.338	.317	.224	.215	.225	.315	.220	.239	.231	.223	.189	.145	.202	.158	.217	.149	.085	.040	.073	.164	.206	.232	.237	.227	.189	.039	.105	****	.193	.281	.429	.418	.597	.396	.405	.441	.427	.397	.431	.437	.435	.433	.420
32 HORNILLO	.198	.189	.160	.265	.250	.167	.177	.174	.260	.170	.186	.176	.172	.153	.101	.145	.112	.170	.107	.047	.002	.023	.117	.155	.180	.195	.178	.148	.014	.067	.037	****	.218	.439	.427	.580	.363	.380	.395	.393	.368	.403	.407	.421	.411	.399
33 SANMAMEDE	.130	.166	.161	.230	.216	.126	.141	.148	.219	.132	.145	.146	.143	.114	.077	.134	.142	.158	.093	.077	.046	.048	.129	.126	.154	.150	.138	.118	.045	.098	.087	.048	****	.423	.393	.588	.342	.366	.396	.368	.361	.407	.386	.400	.399	.368
34 BENASQUE	.213	.145	.245	.154	.141	.219	.200	.255	.119	.216	.162	.171	.178	.194	.266	.312	.243	.297	.150	.318	.246	.245	.326	.263	.223	.249	.262	.283	.243	.345	.246	.272	.243	****	.399	.594	.396	.399	.414	.417	.442	.403	.356	.370	.416	.352
35 GRESIGNE	.054	.190	.135	.266	.256	.061	.149	.099	.198	.172	.157	.163	.150	.181	.190	.287	.271	.166	.167	.243	.212	.261	.232	.259	.219	.178	.175	.164	.193	.263	.215	.235	.174	.216	****	.623	.379	.383	.367	.416	.329	.382	.409	.373	.401	.364
36 TURQUIA	.602	.475	.489	.485	.539	.502	.427	.460	.503	.504	.437	.423	.440	.495	.558	.545	.413	.496	.426	.587	.514	.506	.524	.556	.478	.538	.520	.597	.484	.635	.566	.513	.535	.576	.673	****	.550	.553	.559	.562	.551	.566	.555	.542	.545	.544
37 ARANCEDO	.127	.056	.109	.119	.127	.093	.018	.100	.089	.030	.032	.031	.055	.127	.150	.223	.121	.118	.072	.176	.130	.140	.188	.200	.142	.137	.142	.194	.108	.202	.181	.142	.108	.186	.164	.425	****	.144	.319	.219	.288	.344	.221	.258	.287	.242
38 TRABADA	.141	.069	.096	.130	.135	.094	.023	.108	.090	.036	.053	.033	.062	.153	.170	.231	.131	.146	.089	.198	.144	.141	.198	.220	.169	.166	.170	.217	.118	.227	.184	.152	.126	.194	.169	.434	.010	****	.341	.207	.290	.359	.229	.244	.293	.253
39 LUGO	.135	.149	.073	.165	.163	.072	.107	.036	.175	.145	.101	.085	.059	.178	.203	.246	.164	.111	.117	.265	.199	.209	.236	.259	.223	.112	.157	.177	.176	.290	.258	.206	.193	.251	.158	.431	.117	.132	****	.328	.222	.197	.328	.271	.247	.335
40 MONAST. HERMO	.175	.084	.145	.137	.143	.138	.044	.134	.118	.052	.062	.049	.089	.160	.195	.281	.167	.174	.127	.215	.183	.186	.249	.257	.185	.172	.195	.257	.154	.241	.224	.188	.150	.233	.216	.455	.034	.036	.130	****	.303	.337	.254	.243	.260	.287
41 LILLO DEL BIER	.107	.137	.073	.202	.192	.057	.093	.050	.178	.112	.102	.089	.072	.165	.167	.230	.139	.103	.124	.235	.177	.201	.201	.247	.208	.139	.130	.174	.138	.266	.216	.184	.164	.281	.117	.449	.098	.094	.029	.122	****	.265	.349	.253	.239	.310
42 RIO OZA	.173	.185	.121	.221	.207	.106	.136	.072	.191	.191	.145	.111	.106	.195	.230	.316	.161	.153	.138	.279	.225	.253	.272	.298	.250	.165	.212	.215	.190	.311	.244	.223	.218	.234	.176	.458	.141	.159	.026	.139	.065	****	.352	.300	.246	.375
43 AMIEVA	.170	.035	.145	.104	.111	.139	.043	.140	.067	.047	.054	.032	.083	.137	.201	.272	.135	.163	.107	.244	.202	.222	.258	.212	.143	.177	.148	.250	.178	.264	.250	.214	.177	.159	.205	.444	.042	.059	.136	.069	.158	.161	****	.206	.302	.212
44 P'TO.SAN ISIDRO	.133	.045	.092	.107	.107	.097	.048	.084	.096	.061	.059	.038	.058	.129	.187	.266	.134	.115	.104	.246	.201	.225	.237	.228	.166	.135	.130	.206	.158	.270	.206	.208	.174	.160	.137	.433	.058	.056	.064	.062	.054	.085	.039	****	.257	.242
45 VILLABLINOS	.169	.112	.121	.157	.182	.108	.059	.092	.163	.108	.104	.071	.076	.166	.216	.281	.163	.166	.106	.260	.206	.202	.272	.272	.204	.139	.202	.235	.176	.291	.222	.209	.179	.213	.177	.403	.067	.075	.033	.052	.056	.031	.084	.039	****	.326
46 LUARCA	.134	.027	.094	.107	.106	.097	.036	.101	.074	.045	.033	.016	.032	.101	.177	.237	.110	.126	.072	.236	.186	.199	.234	.176	.110	.136	.100	.219	.164	.260	.221	.203	.153	.133	.139	.451	.034	.046	.125	.073	.108	.158	.016	.025	.085	****

la tabla). Del mismo modo, hay que destacar que cuando calculamos los índices de Wright para las poblaciones de cada subespecie, estos también muestran valores significativos. Existe, por tanto, un desequilibrio tanto en el número como en la distribución de los heterocigotos en las poblaciones ibéricas de *Salamandra salamandra*. Este desequilibrio se manifiesta cuando consideramos las poblaciones en su conjunto, pero también cuando analizamos por separado las poblaciones de cada subespecie.

En las Tabla 8 mostramos las matrices de distancias genéticas de Nei y de cuerda de Cavalli-Sforza entre todas las poblaciones analizadas. Las distancias de Nei, por ejemplo, varían desde 0,005 (Lanz-Lindux) hasta 0,635 (Turquía-Laguna de Los Pájaros). Dentro de las poblaciones ibéricas, la distancia más alta, 0,338, ocurre entre las poblaciones de San Vicente y Lanz. Dentro de la península, las distancias varían por tanto entre 0,005 y 0,338.

Si realizamos un test de Mantel relacionando las distancias geográficas con las distancias genéticas, vemos que no existe una relación directa entre ambas (r = 0,36; p = 0,001). Si realizamos este mismo test para cada grupo de poblaciones pertenecientes a las diferentes subespecies, observamos que sólo en una de ellas, *S. s. bejarae,* (r = 0,7; p = 0,003) existe una relación entre ambas distancias. También llevamos a cabo el análisis juntando grupos de poblaciones de diferentes subespecies. La única relación directa entre distancias genéticas y geográficas se observa al juntar las poblaciones de *S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa* (r = 0,86; p = 0,01) y para el conjunto de poblaciones de *S. s. bejarae* más las de *S. s. almanzoris* (r = 0,80; p = 0,001). En estos casos, estos resultados podrían estar indicando la existencia de fenómenos de aislamiento por la distancia entre esos grupos de poblaciones.

Hipótesis filogenéticas

Partiendo de las distancias genéticas, hemos realizado cuatro análisis distintos, dos UPGMAs (con distancias de Nei y de Cavalli-Sforza y Edwards) y dos "Neighbor-Joining" (también con ambas distancias) (Figs. 14, 15, 16 y 17).

Lo primero que destaca es la separación en todos los análisis de las poblaciones del norte y del centro-sur de la península en dos grandes grupos (aunque en el UPGMA con la distancia de Nei es menos clara). Asimismo, destaca la ausencia de relación aparente entre la posición en los dendrogramas y la posición taxonómica de las poblaciones: todas las subespecies resultan parafiléticas, exceptuando las tres poblaciones de *S. s. fastuosa* que siempre aparecen juntas, unidas, eso sí a la población de S. s. *terrestris* de Benasque (salvo en el UPGMA con la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards, en el que esta población se convierte en el grupo hermano de todas las poblaciones ibéricas). La distribución de las poblaciones dentro de los dos grandes grupos (norte y centro-sur) también es similar en todos los análisis. En el sur, las poblaciones se distribuyen en dos grandes subgrupos. En el primero, las poblaciones de *S. s. almanzoris* se agrupan con las poblaciones de *S. s. bejarae* de Mijares y la población de *S. S. gallaica* de San Mamede. En algunos análisis, la población de Monchique (*S. s. crespoi*) también se incluye en este grupo. En el otro grupo están reunidas las poblaciones de *S. s. morenica*, las

Fig. 14: UPGMA generado con la distancia de Nei (1978).

Fig. 15: UPGMA generado con la distancia de Cavalli-Sforza & Edwards (1967).

Fig. 16: Neighbor-Joining generado con la distancia de Nei (1978). Se indican los valores de bootstrap superiores a 50.

Fig. 17: Neighbor-Joining generado con la distancia de Cavalli-Sforza & Edwards (1967). Se indican los valores de bootstrap superiores a 50.

poblaciones más meridionales de *S. s. bejarae*, la otra población de *S. s. crespoi* y dos poblaciones de *S. s. gallaica* (Sintra y S. de la Estrella). Las salamandras del norte se agrupan también en dos grandes grupos, aunque de una forma menos definida. En el primero aparecen poblaciones de *S. s. gallaica* junto a poblaciones de *S. s. bejarae* y las de *S. s. terrestris*. En el segundo grupo se integran las poblaciones asturianas de *S. s. bernardezi*, junto a las de *S. s. fastuosa*. Asimismo, las poblaciones de *S. s. gallaica* (Trabada) localizadas en la zona de contacto entre esta subespecie y *S. s. bernardezi*, así como poblaciones del Puerto de San Isidro, población que reúne a individuos de *S. s. bernardezi* y *S. s. bejarae* se incluyen en este grupo. Cabe destacar la posición variable de la población de Ronda (*S. s. longirostris*) y de Benasque (*S. s. terrestris*), situándose ambas en alguno de los análisis en la base del dendrograma.

La similitud de los grandes grupos norte-sur generados en los cuatro análisis nos llevó a realizar un nuevo test de Mantel, para determinar si existía una relación entre las distancias genéticas y geográficas entre los dos grandes grupos de poblaciones, con resultado negativo (Norte: r = 0,51; p = 0,001; Sur: r = 0,38; p = 0,005). Eso sí, en los análisis llevados a cabo, se observa que las poblaciones de *S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa*, por un lado, y la población de Mijares (*S. s. bejarae*) junto a la población de San Mamede (*S. s. gallaica*) y las de *S. s. almanzoris*, por otro, están más relacionadas entre ellas. Recordemos que en ambos grupos de poblaciones encontramos una relación positiva entre sus distancias genéticas y geográficas. Por tanto, en al menos dos de los grupos generados en los dendrogramas se puede establecer una relación entre ambas distancias.

En los cuatro análisis de distancia se realizó un bootstrap para determinar la robustez de los grupos en los dendrogramas. Como se puede ver en los dendrogramas generados, hay muy pocos grupos con valores de bootstrap superiores al 50%. Ahora bien, la utilidad de este tipo de test a la hora de trabajar con datos aloenzimáticos no está del todo clara. A pesar de su extensa utilización, existen varios motivos por los que podríamos estar empleando erróneamente este tipo de test con las aloenzimas (VAN DONGEN, 1995). La técnica del bootstrap consiste en inferir la distribución de una muestra de variables aleatorias, independientes y con una distribución común, a partir del análisis de la distribución de nuestros datos, tomando muestras aleatorias sucesivas de nuestros caracteres. Un problema al realizar un bootstrap sobre nuestra matriz de frecuencias alélicas ("bootstrap entre loci") es la no independencia de las variables que estamos utilizando (las frecuencias alélicas), además de asumir que siguen todas una misma distribución, lo cual no tiene por qué ser verdad: todos los loci no presentan las mismas tasas de evolución. Estos problemas se acrecientan al no contar con un número suficientemente elevado de loci (desde un punto de vista estadístico) y al trabajar con grupos que presentan tasas de evolución heterogéneas, como puede ser nuestro caso. Unas de las soluciones posibles sería el realizar el "bootstrap" no sobre las frecuencias alélicas sino sobre los genotipos individuales. Generaríamos así un nuevo conjunto de poblaciones sobre el que poder calcular nuevas frecuencias y dendrogramas. Sin embargo, la validez estadística de este método tampoco ha quedado suficientemente demostrada (VAN DONGEN, 1995). Por todo ello y aún sin contar con unos

Fig. 18: Árbol consenso estricto (arriba) y de majority rule (abajo) de los 152 árboles de 163 pasos generados con el análisis de Máxima Parsimonia y el sistema de codificación de los caracteres de "Mutation Coding".

Fig. 19: Árbol consenso estricto de los cinco árboles obtenidos tras el análisis de Máxima Parsimonia utilizando las frecuencias alélicas como los estados de carácter.

valores de bootstrap representativos, hemos decidido considerar como válidas las relaciones establecidas en los dendrogramas, aunque siempre interpretando los resultados de una forma conservadora.

En el segundo grupo de análisis, los análisis cualitativos, utilizamos dos métodos de reconstrucción diferentes. En primer lugar, consideramos el locus como carácter y las combinaciones alélicas presentes como el estado del carácter, siguiendo el método de codificación de "mutation coding" (Murphy, 1993; Murphy & Doyle, 1998). La matriz contiene 23 caracteres, todos con información filogenética. Del análisis de la matriz de datos obtuvimos 152 árboles más parsimoniosos de 163 pasos cada uno (además de 583 árboles de 164 pasos y 69.516 de 165 pasos). En la Fig. 18, están representados el árbol consenso estricto y el consenso de "majority rule" de los 152 de 163 pasos. La relaciones entre los diferentes grupos no quedan bien definidas y esto se debe fundamentalmente al bajo número de caracteres que hemos podido emplear. En el segundo análisis llevado a cabo, los estados de carácter vienen definidos por las frecuencias alélicas. Como resultado de este tipo de codificación, se generó una matriz con 27 caracteres, de los cuales 22 presentaban información filogenética (más un carácter constante y otros cuatro no informativos). Del análisis de esta matriz obtuvimos cinco árboles más parsimoniosos de igual topología (Fig. 19) y de longitud total 72.3855. En estos árboles se recupera la topología de los análisis fenéticos de distancia. Se distinguen dos grandes grupos, uno que reúne a las poblaciones del norte de la Península y otro en el que se encuentran las poblaciones del centro y del sur. En el primero, se diferencian dos subgrupos. Uno con las poblaciones de *S. s .terrestris* (exceptuando Benasque) junto a poblaciones gallegas de *S. s. gallaica* y a las poblaciones del Bierzo de *S. s. bejarae* y el otro con las poblaciones de *S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa* más la población *terrestris* de Benasque. A este clado del norte, se unen las poblaciones de Fonsagrada y Oscos (poblaciones de *S. s. gallaica* y *S. s. bernardezi* respectivamente situadas en la zona de contacto entre ambas subespecies) y la población de Monchique (*S. s. crespoi*). En el clado centro-sur, diferenciamos también dos subgrupos, uno conteniendo las poblaciones de *S. s. almanzoris* (en este caso, formando un grupo monofilético) junto a la población de *S. s. bejarae* de Mijares y de *S. s. gallaica* de San Mamede y otro subgrupo con las poblaciones de *S. s. morenica*, el resto de poblaciones de *S. s. bejarae* y las poblaciones del centro de Portugal de *S. s. gallaica*. La población de Ronda (*S. s. longirostris*) aparece como grupo hermano del clado centro-sur.

5. Discusión

5.1 El viviparismo en Salamandridae

La estrategia reproductora ancestral en la familia Salamandridae es el oviparismo (puesta de huevos) (Duellman & Trueb, 1986). La aparición del ovoviviparismo y del viviparismo se restringe a algunas de las especies de salamandras del clado

que hemos incluido en este trabajo. *Ch. lusitanica* y *M. caucasica* presentan el modo de reproducción ancestral, mientras que en el resto se habrían desarrollado las estrategias derivadas. El viviparismo (el parto de juveniles terrestres después de un desarrollo completo intrauterino) ocurre en cuatro especies distintas: *S. atra*, *S. lanzai*, *S. salamandra* (poblaciones del norte de la Península Ibérica) y *M. luschani*. Ahora bien, la monofilia del género *Mertensiella* ha sido puesta en entredicho en tres trabajos recientes (Titus & Larson, 1995; Veith *et al*., 1998; Weisrock *et al*., 2001). Siguiendo los resultados de nuestros análisis y los de los trabajos citados, podríamos considerar a *Mertensiella* como un género parafilético e incluir a *M. luschani* dentro del género *Salamandra* (*S. luschani*), como de hecho había sido propuesto con anterioridad basándose en caracteres morfológicos (Özeti, 1967; Wake & Özeti, 1969), estabilizando además la nomenclatura de ambos géneros. De esta forma, podemos decir que la aparición del viviparismo en Salamandridae queda restringida al género *Salamandra*.

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación del citocromo b en este trabajo (Fig. 4), aunque no concluyentes, unidos a los datos bibliográficos en los que se emplean marcadores moleculares más apropiados para resolver relaciones filogenéticas entre linajes que han divergido hace más tiempo (Veith *et al*., 1998; Weisrock *et al*., 2001), señalan la monofilia del género *Salamandra*, incluyendo a *S. luschani* como la especie basal del género. El viviparismo, definido como el parto de juveniles terrestres metamorfoseados, podría considerarse, por tanto, como una sinapomorfía del género. Sin embargo, en cada caso se trata de un fenómeno fisiológico con características diferentes. El "viviparismo" sería, filogenéticamente hablando, una homoplasia. El viviparismo en cada especie del género *Salamandra* ha surgido a través de un proceso histórico y fisiológico diferente, constituyendo, efectivamente, procesos de evolución convergente o paralela. Ahora bien, todos estos tipos diferentes de viviparismo parten de una base común, tienen un origen filogenético común representado por la extensión del periodo de retención oviductal. El paso de una estrategia ovípara a una ovovivípara o vivípara implica necesariamente la extensión del periodo en el que los huevos son retenidos dentro del tracto genital materno. Esta característica, la extensión de la retención oviductal, sí podría ser considerada como una sinapomorfía del género *Salamandra*. Este fenómeno ha servido de precursor necesario para la evolución de las diferentes estrategias reproductoras derivadas que se observan en el género, tales como el viviparismo matrotrófico de *S. atra* o el ovoviviparismo de *S. salamandra*, sobre el que posteriormente ha evolucionado la estrategia vivípara que estamos analizando. Partiendo de nuestros datos y utilizando la calibración para el citocromo-b de 0,8% de divergencia por millón de años (García-París *et al*., 1998; Tan & Wake, 1995) podemos situar el momento de separación del linaje *Salamandra* del resto de las salamandras hace aproximadamente unos 15 millones de años.

Durante el Oligoceno y el Mioceno (hace unos 25 millones de años) coexistían en Europa *Salamandra sansaniensis* (especie fósil, antecesora de *S. salamandra*) y *Chioglossa meini* (otra especie fósil, antecesora de *Ch. lusitanica*) (Veith *et al*., 1998).

Estos autores consideran que la extensión del periodo de retención oviductal (denominado por ellos viviparismo lecitotrófico) podría haber ocurrido en este momento. En *S. sansaniensis*, por tanto, aparecería la innovación que posteriormente permitió la diversificación de las estrategias reproductoras dentro del género *Salamandra*.

Entre el Oligoceno superior y el Mioceno medio (25-20 millones de años) se formó un brazo de tierra que se correspondería con lo que en la actualidad son las Penínsulas Balcánica, Itálica e Ibérica y Turquía (Oosterbroek & Arntzen, 1992), separando el mar Thethys del Parathethys y permitiendo la dispersión de *Ch. meini* y de *S. sansaniensis* desde su lugar de origen en el noroeste europeo hacia el este y hacia el sur, hacia la Península Ibérica. Posteriormente, durante el Mioceno medio (entre 13 y 17 millones de años) se formó un nuevo puente transmediterráneo [la llamada Asian Minor – Transmediterranen distribution o ATM (Oosterbroek & Arntzen, 1992)] que posibilitó de nuevo el intercambio de fauna ente ambas regiones. Según Weisrock *et al.* (2001), la ruptura de estas dos conexiones transmediterráneas se tradujo en dos eventos vicariantes distintos entre Europa y Anatolia que marcaron la separación entre *Ch. lusitanica* y *M. caucasica* por un lado y *S. luschani* con el resto de *Salamandra* por el otro. La primera separación debió ocurrir entre unos 20 y 15 millones de años, mientras que la segunda debió suceder entre 13 y 17 millones de años (Veith *et al.*, 2000; Weisrock *et al.*, 2001).

La diversificación específica dentro del género *Salamandra* se habría producido hace entre 10 y 5 millones de años, después de haber aprovechado la posibilidad de dispersión ofrecida por este puente transmediterráneo ATM hace 13-15 millones de años. La diferenciación de las especies dentro del género *Salamandra* es por tanto anterior al Pleistoceno. La separación de *S. infraimmaculata*, distribuida por Turquía, Siria, Líbano, Iraq y parte de Irán, del resto de especies de *Salamandra* data de hace unos 13 millones de años, lo que se correspondería bien con la ruptura de este puente transmediterráneo. La separación entre *S. algira* y el resto de especies de *Salamandra* se produjo hace unos 8 millones de años y no está por lo tanto relacionada con la formación del estrecho de Gibraltar (Steinfartz *et al.*, 2000). La separación de las especies *S. corsica* y *S. salamandra* hace unos 6 millones de años (Veith *et al.*, 1998) y de las especies *S. corsica* y *S. atra* hace 5 millones de años (Steinfartz *et al.*, 2000) entran también dentro de este rango ple-pleistocénico.

5.2 El viviparismo en *S. salamandra*

La diferenciación de *Salamandra salamandra* habría empezado, por tanto, en el Plioceno, presentando desde su origen un modo de reproducción ovovivíparo. Sobre esta base, evolucionó posteriormente la estrategia vivípara que observamos hoy en día en las poblaciones del norte de la Península Ibérica. En este apartado intentaremos delimitar el origen del viviparismo a través del análisis de los diferentes marcadores empleados.

El paisaje fenotípico

Dentro de la gran variabilidad morfológica intraespecífica que se observa en *S. salamandra* en toda su área de distribución, variabilidad que ha servido de criterio para describir las subespecies sobre todo a partir de los tamaños corporales y los diseños de coloración, destacan las poblaciones de *S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa*. Estas subespecies son las únicas que presentan un patrón rayado, en vez del patrón de coloración moteado típico. Poseen, también, un tamaño corporal menor que el del resto de las salamandras y alguna otra característica propia como un morro redondeado en vez de puntiagudo. Además, en ambas subespecies encontramos el modo de reproducción vivíparo.

El paisaje nuclear

Desde un punto de vista nuclear, se aprecian unos niveles de variabilidad relativamente bajos. Destaca la ausencia de alelos marcadores y el bajo número de alelos exclusivos que diferencien claramente grupos de poblaciones. Esto se refleja, por ejemplo, en las posiciones diferentes en las que se encuentran algunas poblaciones en las reconstrucciones filogenéticas. Además, la variabilidad que se observa no se distribuye de acuerdo con las subespecies descritas. Esto queda patente tanto en los análisis de distancia o filogenéticos llevados a cabo como en los estadísticos F de Wright calculados. Las subespecies son, desde un punto de vista nuclear, agrupaciones parafiléticas de poblaciones. Se observa cierta estructuración en la distribución de la variabilidad, como por ejemplo en la división entre las poblaciones del norte y del sur de la Península en todos los análisis llevados a cabo. Es interesante ver también la relación positiva entre las distancias genéticas y geográficas cuando se agrupan las poblaciones de diferentes subespecies, como, por ejemplo, cuando agrupamos las poblaciones de *S. s. almanzoris* y *S. s. bejarae* o las poblaciones de *S. s. bernardezi* con las de *S. s. fastuosa*. Esto implica la posible existencia de cierta cohesión genética entre los grupos de poblaciones, que se estarían diferenciando por un proceso de aislamiento por la distancia. En el caso de *bernardezi* y *fastuosa*, esta cohesión genética va asociada a la similitud a nivel fenotípico que veíamos en el apartado anterior: un mismo patrón de coloración y un mismo modo de reproducción. Si nos guiáramos exclusivamente por este marcador nuclear, podríamos pensar que la homogeneidad genética podría estar reflejando o una cierta panmixia entre poblaciones, al menos dentro de las poblaciones del norte y las del centro y sur de la Península, o bien un escenario en que las subespecies se hubieran originado muy recientemente, por lo que aún no hubiera transcurrido el tiempo suficiente para la fijación diferencial de alelos en los distintos grupos de poblaciones. La hipótesis de la panmixia se puede descartar en primer lugar por los índices de Wright que nos indican que existe una estructuración de la variabilidad genética y en segundo lugar por las características propias de la salamandra, sobre todo en lo que se refiere a su baja capacidad de dispersión. La radiación reciente de las subespecies de *Salamandra salamandra* también tiene que se descartada, a partir de los resultados obtenidos con el otro marcador genético.

El paisaje mitocondrial

Por su parte, el patrón de variabilidad del ADN mitocondrial tampoco guarda una relación directa con la distribución de las subespecies. De nuevo, éstas aparecen como agrupaciones parafiléticas en los análisis filogenéticos realizados con el citocromo b, exceptuando los casos de *S. s. longirostris*, *S. s. almanzoris*, *S. s. crespoi* y *S. s. morenica*. *S. s. longirostris* es el grupo hermano del resto de poblaciones ibéricas, mientras que las otras tres subespecies pertenecen a un mismo clado mitocondrial generado en el análisis filogeográfico. Las poblaciones vivíparas no aparecen agrupadas en un mismo clado, lo que nos podría indicar que el viviparismo se originó de manera independiente en varios puntos distintos, no teniendo por tanto un origen monofilético. El patrón de distribución de la variabilidad genética mitocondrial tampoco se corresponde ni con los marcadores fenotípicos (patrones de coloración o viviparismo) ni con los marcadores nucleares.

Cada marcador, por tanto, genera un paisaje evolutivo distinto siendo el paisaje mitocondrial el más discordante.

5.3 Diferentes marcadores, diferentes paisajes evolutivos: análisis filogeográfico de las discordancias

En las poblaciones del norte de la península, vemos que existe cierta relación entre los marcadores fenotípicos (la coloración y los modos de reproducción) y la variabilidad genética nuclear. Sin embargo, la distribución de los marcadores mitocondriales difiere claramente de los anteriores.

Las genealogías mitocondriales no tienen por qué coincidir con la historia filética de los organismos que estemos estudiando. La teoría de la coalescencia predice que, transcurrido un lapso de tiempo suficiente, la filogenia del gen que hayamos empleado convergerá o reflejará la filogenia del grupo de estudio al haberse llegado a conseguir la monofilia recíproca (Hudson, 1990; Neigel & Avise, 1993). La existencia de discordancias entre marcadores mitocondriales y nucleares ha sido explicada normalmente por la separación reciente de los linajes estudiados, con lo que el tiempo transcurrido no ha sido suficiente para que las filogenias de ambos marcadores converjan. Si tratamos con linajes más antiguos, las discordancias entre marcadores han sido explicadas por procesos de retención de polimorfismos ancestrales o de eliminación rápida de algunos linajes ("rapid lineage sorting"), además de por procesos de transferencia horizontal de genes asociados a eventos de reticulación (Ruedi *et al.*, 1997).

Al analizar la evolución de *Salamandra salamandra* en la Península Ibérica, contamos con cinco tipos de marcadores distintos: las secuencias de ADN mitocondrial, las aloenzimas nucleares, las estrategias vitales, la morfología y los patrones de coloración. Los cuatro últimos coinciden en algunos aspectos de su distribución geográfica, mientras que el ADN mitocondrial difiere claramente. Las discordancias son patentes en las poblaciones del norte de la península, en la zona en la que confluyen cinco subespecies con dos modos de reproducción diferentes y agrupadas en tres lina-

Fig. 20: Zonas de contacto entre los linajes definidos por los marcadores nucleares y mitocondriales. Como se puede observar, las zonas de contacto no concuerdan salvo en la zona más occidental, entre las subespecies *S. s. gallaica* y *S. s. bernardezi*.

jes mitocondriales distintos. Las discordancias más notables están reflejadas en la Fig. 20. Como podemos observar, no existe una divergencia mitocondrial entre las poblaciones pirenaicas de *S. s. terretris* y las de Cantabria, País Vasco y Navarra de *S. s. fastuosa*. Sin embargo, estos dos grupos de poblaciones difieren claramente en cuanto a su ADN nuclear (señalado como "I" en la Fig. 20). El patrón de distribución de los haplotipos mitocondriales que se observa podría estar reflejando un proceso de dispersión y por tanto de flujo génico en dirección este-oeste, consiguiendo que los haplotipos "*terrestris*" se fijaran en las poblaciones "*fastuosa*". Esta hipótesis es improbable por dos motivos. Existe, en primer lugar, un sesgo en la capacidad de dispersión de la especie, siendo los machos los que por lo general se dispersan más. Dado que el ADN mitocondrial sigue una herencia matrilineal, el sesgo en la dispersión y en la colonización dificultaría la fijación de los haplotipos foráneos en *S. s. fastuosa*. Además, el proceso de dispersión y flujo génico implicaría también la transmisión de otras características (como por ejemplo los patrones de coloración), hecho este que no ocurre como queda reflejado en la discordancia nuclear presente en el límite de distribución de ambas subespecies. La segunda discordancia destacable se aprecia dentro de las salamandras vivíparas (*S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa*). Mientras que la perspectiva nuclear nos muestra un conjunto homogéneo de poblaciones bien diferenciado del resto, encontramos tres haplotipos mitocondriales diferentes, dos de ellos dentro de las subespecie *bernardezi* ("II" en la Fig. 20).

Más que un patrón de dispersión o de flujo génico, el patrón de distribución de los haplotipos mitocondriales estaría revelando procesos de diferenciación y de divergencia relativamente antiguos: refleja la distribución de los linajes haplotípicos de *Salamandra salamandra* en un momento determinado de su historia evolutiva. Dado que los dendrogramas y filogenias aloenzimáticas se basan en un número elevado de loci nucleares, es lógico pensar que no sean tan susceptibles de reflejar procesos de desaparición de linajes o de retención de polimorfismos ancestrales como las filogenias basadas en un único gen mitocondrial (Murphy *et al.*, 1996). Además, los procesos de recombinación tienden a homogeneizar el acervo génico de poblaciones que han desarrollado un cierto grado de diferenciación y que entran en contacto. Podemos asumir, entonces, que el patrón de distribución de las aloenzimas refleja la historia evolutiva poblacional más reciente de las salamandras. Los marcadores nucleares, por tanto, reflejarían los contactos secundarios posteriores a la diferenciación de los linajes mitocondriales. La existencia de discordancias entre los diferentes marcadores no implica que tengamos que elegir entre escenarios evolutivos contradictorios, sino que ambos nos están revelando la evolución de *Salamandra salamandra* en la Península Ibérica: un mismo escenario evolutivo, pero en diferentes momentos de su historia.

Podemos explicar los patrones de distribución de la variabilidad genética observada a partir de procesos de una diferenciación antigua de linajes, seguidos de una o varias expansiones del rango de distribución de los linajes en dirección oeste-este, induciendo los contactos secundarios entre grupos que habrían alcanzado cierto grado de diferenciación. A causa de estos procesos demográficos, los genomas nucleares y mitocondriales habrían dejado diferentes huellas en las poblaciones, representadas por las discordancias que encontramos entre los marcadores. Hemos reflejado el modelo de difusión de ambos marcadores en las zonas de contacto en la Fig. 21. En un primer momento (A) se produce la dispersión del grupo (individuos con genomas nucleares y mitocondriales blancos) hacia la zona ocupada por los individuos del segundo grupo (nuclear gris oscuro y mitocondrial negro). Se establece una zona de contacto donde ambos grupos hibridarán. A medida que el avance del primer grupo sigue (B), la zona de hibridación se desplaza en dirección del avance de los individuos (en nuestro caso, dirección oeste-este). Pero en esta segunda zona híbrida, además de los individuos "puros" (blancos), encontramos también individuos híbridos (genoma nuclear híbrido, en gris claro) con mitocondrial negro y otros con mitocondrial blanco que también van a aparearse con los individuos de genoma nuclear y mitocondrial negros. Si sigue la dispersión (C), en la tercera zona híbrida la proporción de individuos blancos puros desciende y, lo que es más importante, también desciende la proporción de individuos híbridos con mitocondrial blanco. Si seguimos con el avance (D) en la zona híbrida "n", tendremos exclusivamente apareamientos entre individuos híbridos con el mitocondrial negro e individuos puros "negros". Se forma una suerte de barrera que impide que el mitocondrial "invasor" prosiga su avance. Si analizamos la composición nuclear de los individuos en esta zona, podremos llegar a la conclusión de que se trata en una zona de hibridación. Si analizamos exclusivamente el genoma mitocondrial, no encontrare-

Fig. 21: Modelo de dispersión de los marcadores nucleares y mitocondriales en las zonas de hibridación (ver el texto para una explicación detallada).

mos diferencias entre los individuos. Si analizamos todo el transepto en su conjunto, observaremos que el ADN mitocondrial nos ofrece una perspectiva histórica, reflejando la disposición de los linajes mitocondriales en el momento en el que se establece el contacto entre los diferentes grupos, mientras que el ADN nuclear nos muestra la evolución de la zona de hibridación después del primer contacto. Las discordancias entre marcadores que observamos en las zonas de contacto en la Cordillera Cantábrica pueden ser explicadas de esta manera. Asimismo, este modelo explicaría como se ha transmitido el viviparismo, junto a otras características codificadas por el genoma nuclear como el patrón de coloración rayado, desde su centro de origen (clados mitocondriales 3-2 o 3-4) hacia el este.

A partir de los análisis filogeográficos y filogenéticos realizados, podemos plantear un escenario paelobiogeográfico en el que situar los procesos de diferenciación de los linajes mitocondriales (Fig. 22) y la diversificación de las estrategias reproductoras. Partimos del Plioceno superior, en el que, como veíamos en el apartado anterior, se habría producido la diversificación dentro del género *Salamandra*. No conocemos las distribución exacta de *Salamandra salamandra* en Europa en ese momento, aunque

Fig. 22: Diferenciación de los linajes mitocondriales en la Península Ibérica. **A y B**: separación de *S. s. longirostris* asociada a la formación de la cuenca del Guadalquivir. **B y C**: diferenciación del resto de linajes (ver el texto para una explicación detallada).

muy probablemente ocupara un área similar a la actual. El primer evento que destacamos es la diferenciación en el sur de la Península de un grupo de poblaciones que se corresponden con la actual *S. s. longirostris*. Esta separación habría ocurrido entre 2 y 4 millones de años y estaría asociada a la formación del sistema fluvial del Guadalquivir (García-París *et al.*, 1988) (Fig. 21 A y B). *S. s. longirostris* aparece en todos los análisis filogenéticos como grupo hermano del resto de salamandras ibéricas; asimismo, los haplotipos correspondientes a estas poblaciones no aparecen conectados al resto en la red de haplotipos generada en el análisis filogeográfico.

Del grupo de poblaciones que quedaron al norte del Guadalquivir después de su formación, se fragmentaron posteriormente cuatro linajes distintos de salamandras. En uno de ellos (clado 3-3 del análisis filogeográfico, Fig. 21 C y D) estarían incluidas las poblaciones actuales de *S. s. morenica*, *S. s. crespoi* y *S. s. almanzoris*. Este clado habría alcanzado su distribución actual por un proceso de "colonización de larga distancia" (ver Tabla 3). En el segundo clado (clado 3-1) estarían incluidas todas las poblaciones actuales de *S. s. bejarae*, *S. s. gallaica*, *S. s. terrestris* y *S. s. fastuosa*. Este es el clado de distribución más

amplia, a la que se habría llegado por un proceso de expansión continua (Tabla 3). Los dos últimos clados (3-2 y 3-4) corresponderían a las poblaciones actuales de *S. s. bernardezi*. Si nos guiamos por el análisis filogeográfico (Fig. 9), el clado 3-1 sería el clado más antiguo a partir del cual se habrían separado el clado 3-3 por un lado y el clado 3-4 por otro. A partir de este último, se habría fragmentado posteriormente el clado 3-2.

Se ha relacionado a *S. s. bernardezi* con la subespecie italiana *S. s. giglioli* (Joger & Steinfartz, 1994b; Steinfartz *et al.*, 2000). El rango de distribución de esta última se restringe al sur de Italia. De confirmarse esta relación, nos estaría indicando que el área de distribución del linaje precursor del conjunto *bernardezi-giglioli* debió ser mucho más amplia que la actual. Si la diferenciación específica dentro del género *Salamandra* ocurrió durante el Plioceno, los procesos de fragmentación de los linajes mitocondriales descritos dentro de *Salamandra salamandra* debieron ocurrir durante el Plioceno superior y el Pleistoceno, posiblemente relacionados con los periodos glaciares e interglaciares. Los cambios climáticos ocurridos durante esta época afectaron muy especialmente a la cornisa cantábrica (Crowley & North, 1991). En estas regiones, los hielos glaciares ocuparon toda la región por encima de los 750 metros, aunque al ser una zona de orografía muy pronunciada, en los valles y en las zonas más costeras persistió durante el Pleistoceno un clima más suave (Uzquiano, 1992; 1995). Durante los periodos glaciares, las poblaciones de salamandras debieron refugiarse en las zonas libres de hielo en las penínsulas meridionales europeas, como muchas otras faunas europeas (Hewitt, 1996). El linaje precursor de los dos clados mitocondriales de *S. s. bernardezi* y de la subespecie italiana *S. s. giglioli*, con una amplia distribución, debió también descender hacia el sur y refugiarse en las zonas en las que encontramos a estas subespecies en la actualidad, no pudiendo recolonizar posteriormente de nuevo las zonas antes habitadas. Otro linaje, como por ejemplo el clado 3-1, también debió refugiarse en la Península Ibérica, aunque éste sí consiguió posteriormente, en épocas climáticas más propicias, extender su área de distribución hacia el norte por un proceso de expansión continua. En la Fig. 23, mostramos un escenario hipotético que representaría estas fluctuaciones. En un primer paso (A), los refugios glaciares provocarían el aislamiento y la diferenciación de los linajes mitocondriales. En un segundo paso (B) y durante un periodo con una climatología más favorable, se favorecería la dispersión, estableciéndose los contactos secundarios entre los linajes ya diferenciados. En un tercer momento (C), se producirían los procesos demográficos antes explicados quedando reflejados en las discordancias entre los marcadores nucleares y mitocondriales.

Con este escenario paleobiogeográfico y con el modelo demográfico poblacional planteado, podemos situar la aparición del viviparismo y explicar su posterior evolución. El paso de la extensión del periodo de retención oviductal ya se produjo durante la diferenciación del género *Salamandra*, como vimos anteriormente, por lo que las poblaciones de *S. salamandra* durante el Plioceno y el Pleistoceno ya debían presentar el modo de reproducción derivado, el ovoviviparismo. Dado que *S. s. giglioli* presenta también este modo de reproducción ovovivípara, podemos suponer que la aparición del viviparismo en las poblaciones del norte de la Península es posterior a la separación de *S. s.*

Fig. 23: Aislamiento y dispersión de los diferentes linajes por las fluctuaciones climáticas. **A**: aislamiento y diferenciación de los linajes A, B, y C en algún periodo glaciar. **B**: expansión y establecimiento de contactos secundarios entre linajes. **C**: Dispersión e hibridación. En negro, isométrica de los 1000 m.

giglioli y *S. s bernardezi*. Al no haber incluido ejemplares de la especie italiana en nuestro estudio, no podemos datar la separación entre ambos linajes. Sí podemos, sin embargo, datar la separación de las poblaciones incluidas en los clados mitocondriales 3-2 y 3-4 del resto de poblaciones peninsulares, situándola aproximadamente entre 300 y 400 mil años, teniendo siempre presente que esta separación es posterior a la separación *giglioli-bernardezi*. Podemos situar el origen del viviparismo en tres situaciones distintas. Pudo haberse originado en el clado 3-2 y haberse transmitido después al clado 3-4 cuando éste se hubiera diferenciado. Pudo también haberse originado en el clado 3-2 pero después de que el clado 3-4 se hubiera diferenciado, transmitiéndose después a éste por contacto y flujo génico. Por último, el viviparimo pudo haber surgido en el clado 3-4 y haberse transmitido posteriormente al clado 3-2 por flujo génico. Cualquiera de las tres hipótesis es posible y con los datos obtenidos no podemos optar por una de ellas. La explicación de las discordancias nucleares y mitocondriales que hemos propuesto asume

la existencia de un flujo génico en dirección oeste-este, que habría causado la homogeneización del acervo génico nuclear entre las poblaciones de *S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa*. Por tanto, después de su aparición y del contacto secundario entre los linajes mitocondriales, el viviparismo se habría transmitido de esta manera, junto al resto de características codificadas por el ADN nuclear como pueden ser los patrones de coloración, instalándose en los distintos clados mitocondriales del norte peninsular.

El uso conjunto de marcadores genéticos nucleares y mitocondriales analizados bajo una aproximación filogenética y filogeográfica nos ha permitido situar la aparición del viviparismo en un contexto palebiogeográfico a la vez que explicar cómo se ha expandido desde su origen hasta la distribución que observamos hoy en día. Hay que destacar la importancia del análisis de las discordancias entre marcadores como fuente potencial de información y no como hipótesis contradictorias que hay que elegir o rechazar.

Una vez establecido el origen histórico de la novedad evolutiva, vamos a seguir en el siguiente capítulo analizando las característica de las estrategia reproductoras en *Salamandra salamandra* desde un punto de vista ontogénico.

Apéndices

Apéndice 1. Secuencias alineadas del gen mitocondrial citocromo b. Los guiones indican las coincidencias nucleotídicas.

```
                                  10         20         30         40         50         60         70         80         90        100
Pto._Padornelo            CCCCTCCTAA AAATCATTAA TAACTCCTTT ATTGACCTTC CCACCCCATC AAACATCTCC TACTGATGAA ACTTCGGCTC TCTTTTAGGC ATTTGCCTAA
Fonsagrada                ??........ .......... ...T...... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Castromarín               ??........ .......... ...T...... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Pto. Palo-2'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lugo-1'                  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lugo-2'                  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Trabada-1'               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Trabada-2'               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Palacios del Sil-1'      .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Palacios del Sil-2'      .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Arguenos-1'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Arguenos-2'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Arguenos-3'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Benasque-1'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Benasque-2'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lanz-1'                  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lanz-2'                  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lindux-1'                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lindux-2'                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Mijares-10H'             .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
San_Pablo                 .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Mijares-2'               .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Sierra_Estrela            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Isoba-1'                 ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Isoba-2'                 ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Isoba-3'                 ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Emb. del Porma-1'        ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Emb. del Porma-2'        ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lillo Bierzo-1'          ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lillo del Bierzo-2'      ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Montseny                  .......... ....T..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Gresigne                  .......... ....T..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Setcasses                 .......... ....T..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Ucieda-1'                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Ucieda-2'                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Ucieda-3'                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Ucieda-4'                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lillo Bierzo-101'        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Pto._Escudo               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
San_Mamede                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Sintra                    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Cabezuelas                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Hervas                    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Pto._ElPalo1              ??........ .......... ...T...... .......... .......... ...T...... .......... .......... .........T ..........
Circo_de_Gredos           .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
Cinco_Lagunas             .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
Peñalara                  .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
Laguna_Los_Pajaros        .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
El_Hornillo               .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
El_Fito                   ??........ .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Luarca-1H'               .......... .......... ...T...... .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........
'Luarca-75H'              .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Oviedo-1'                .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Oviedo-2'                .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Oviedo-3'                .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Oviedo-4'                .......... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Cofiñal-69M'             .......... .......... ...T...... .......... ..G....C.. .........T .......... .......... .......... ..........
'Trabada-17M'             .......... .......... ...T...... .....T.... .......... ...T...... .......... .......... .........T ..........
```

```
'Amieva-27M'          .......... .......... ...T...... .......... ..G....C.. .........T .......... .......... .......... ..........
'Amieva-1'            .......... .......... ...T...... .......... .......C.. .......... .......... .......... .......... ..........
'Amieva-2'            .......... .......... ...T...... .......... .......C.. .......... .......... .......... .......... ..........
'Río Oza-1'           .......... .......... ...T...... .......... .A........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Río Oza-64M'         .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Monast. Hermo-1'     .......... .......... ...T...... .....T.... .......... ...T...... .......... .......... .........T ..........
'Monast. Hermo-2'     .......... .......... ...T...... .....T.... .......... ...T...... .......... .......... .........T ..........
'Monast. Hermo-3'     .......... .......... ...T...... .....T.... .......... ...T...... .......... .......... .........T ..........
'Villablinos-1'       .......... .......... ...T...... .....T.... .......... ...T...... .......... .......... .........T ..........
'Pto. Palo-48'        .......... .......... ...T...... .....T.... .......... ...T...... .......... .......... .........T ..........
'Sierra Monchique-1'  .......... .......... ...T.....C .......... .T........ .......... .......... .......... .........A ..........
'Sierra Monchique-2'  .......... .......... ...T.....C .......... .T........ .......... .......... .......... .........A ..........
Santiago_do_Cacem     .......... .......... ...T.....C .......... .T........ .......... .......... .......... .........A ..........
Sierra_Morena         .....T.... .......... ...T...... ........C. .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
Sierra_Aracena        .....T.... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Riópar-1'            .....T.... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Riópar-2'            .....T.... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
Baños_de_la_Encina    .....T.... .......... ...T...... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ..........
'Sierra Grazalema-1'  ...A...... .......... ...T...... .......... ....T..... .......... .......... .......... .......... ..........
'Sierra Grazalema-2'  ...A...... .......... ...T...... .......... ....T..... .......... .......... .......... .......... ..........
Ronda                 ...A...... .......... ...T...... .......... ....T..... .......... .......... .......... .......... ..........
S._atra               .......... .......... ..G....... .......... .T........ .......... .......... .......... ....C..... ..........
S._algira             ??.T...... .......... .......... ........C. .......... .......... .....G.... .T..T..G.. ....C..... .........G
S._lanzai             .......... .......... .......... .......... .T........ .......... .......... .......... ....C.T... ..........
Ch._lusitanica        .....AT... ....T..... C.....A... .....T..C. .A....C.. .........A ..T....... .T..T..... C...C.C..A ..C.......
M._luschani           ..A..A.... ....T..C.. .T.T...... ........C. .A........ ......TA.. .......... .......... C..AC.T... .........G
M._caucasica          ..A....... ....T..... CGG...T..C .....TT.A. .A.....T.. ......T... ..T.....G. ....T..... AT.GC....A ..C.....T.
'M. luschani-3'       .....A.... ....T..... ..G....... .......... .A.....C.. ......T..T .......... .......... C..AC..... ..C.......
'M. luschani-4'       .....A.... ....T..... ..G....... .......... .A.....C.. ......T..T .......... .......... C..AC..... ..C.......
'M. luschani-2'       ..A..A.... ....T..C.. .T.T...... ........C. .A........ ......TA.A .......... .......... C..AC.T... .........G
T._marmoratus         ...T.A.... ....T..C.. CGG...A..C ..C..T..C. .A..A..... T........A .......... .T..T..... .......... ..C...T...

                                  110        120        130        140        150        160        170        180        190        200
Pto._Padornelo        TTACCCAAAT CTTAACAGGT TTATTTTTGG CTATACACTA CACGGCAGAC ACATACTCAG CATTTTCCTC AGTAGCACAT ATCTGCCGAG ATGTAAACTA
Fonsagrada            .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
Castromarín           .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Pto. Palo-2'         .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Lugo-1'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Lugo-2'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Trabada-1'           .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Trabada-2'           .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Palacios del Sil-1'  .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Palacios del Sil-2'  .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Arguenos-1'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Arguenos-2'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Arguenos-3'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Benasque-1'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Benasque-2'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Lanz-1'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Lanz-2'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Lindux-1'            .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Lindux-2'            .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Mijares-10H'         .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
San_Pablo             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Mijares-2'           .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Sierra_Estrela        .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... .......T..
'Isoba-1'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Isoba-2'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
```

```
'Isoba-3'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Emb. del Porma-1'     .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Emb. del Porma-2'     .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Lillo Bierzo-1'       .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Lillo del Bierzo-2'   .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Montseny               .......... .......... .......... .......... .......... .......T.. ....C..... .........C .......... ..........
Gresigne               .......... .......... .......... .......... .......... .......T.. ....C..... .........C .......... ..........
Setcasses              .......... .......... .......... .......... .......... .......T.. ....C..... .........C .......... ..........
'Ucieda-1'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Ucieda-2'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Ucieda-3'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Ucieda-4'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Lillo Bierzo-101'     .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Pto._Escudo            .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
San_Mamede             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Sintra                 .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Cabezuelas             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Hervas                 .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Pto._ElPalo1           .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Circo_de_Gredos        .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Cinco_Lagunas          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Peñalara               .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Laguna_Los_Pajaros     .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
El_Hornillo            .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
El_Fito                .......... .......... .......... .......... T.....C... .......... ....C..... .......... .......... ..........
'Luarca-1H'            .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Luarca-75H'           .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Oviedo-1'             .......... .......... .......... .......... T.....C... .......... ....C..... ....A....C .......... ..........
'Oviedo-2'             .......... .......... .......... .......... T.....C... .......... ....C..... ....A....C .......... ..........
'Oviedo-3'             .......... .......... .......... .......... T.....C... .......... ....C..... ....A....C .......... ..........
'Oviedo-4'             .......... .......... .......... .......... T.....C... .......... ....C..... ....A....C .......... ..........
'Cofiñal-69M'          .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Trabada-17M'          .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Amieva-27M'           .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Amieva-1'             .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Amieva-2'             .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Río Oza-1'            .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Río Oza-64M'          .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Monast. Hermo-1'      .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Monast. Hermo-2'      .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Monast. Hermo-3'      .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Villablinos-1'        .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Pto. Palo-48'         .......... .......... .......... .......... T......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Sierra Monchique-1'   .......... .......... .......... .......... .........T .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Sierra Monchique-2'   .......... .......... .......... .......... .........T .......... ....C..... .........C .......... ..........
Santiago_do_Cacem      .......... .......... .......... .......... .........T .......... ....C..... .........C .......... ..........
Sierra_Morena          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Sierra_Aracena         .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Riópar-1'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Riópar-2'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
Baños_de_la_Encina     .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....C..... .........C .......... ..........
'Sierra Grazalema-1'   .C.....G.. .......... .......... .......... ...A...... .....T.... ....C..... .........C .......... .C........
'Sierra Grazalema-2'   .C.....G.. .......... .......... .......... ...A...... .....T.... ....C..... .........C .......... .C........
Ronda                  .C.....G.. .......... .......... .......... ...A...... .....T.... ....C..... .........C ........T. .C........
S._atra                .......... .C........ .......... .......... .......... .......... ....C..... ...C.....C .......... .C........
S._algira              .......... TC.......C ........A. .......T.. T..A...... ....G..... ....C..... .....T...C ..T....... .C........
S._lanzai              .......... .C.G.....C ........A. .......... .......... .......... ....C..... ....A....C .......... .C........
Ch._lusitanica         ..G.A..... TA....G..A .....CC.A. .C..G..... T..A..C... ..T.G..... ....C..... T.....C... .......... .C..T..T..
M._luschani            ..G....... .C.......C .....CC.A. .C........ ...A...... ...C...... .......... ......T..C .......... .......T..
```

```
M._caucasica          ....A..... TC.T...... C.....C.A. .......T.. T..A.....T .......... ....C..... ......C..C ..T..T.... .C..C.....
'M. luschani-3'       ..G....... .C.......C .....C..A. ....G..... ...A...... .......... ....C..... ...G..T... ..T....... .C.....T..
'M. luschani-4'       ..G....... .C.......C .....C..A. ....G..... ...A...... .......... ....C..... ...G..T... ..T....... .C.....T..
'M. luschani-2'       ..G....... .C.......C .....CC.A. .C........ ...A...... ...C...... .......... ......T..C .......... .......T..
T._marmoratus         ....A..G.. TC.T.....A C....CC.A. .A..G..... T..A...... ...C.A.... .......A.. T..T..C... ..T.....T. ..........

                                 210        220        230        240        250        260        270        280        290        300
Pto._Padornelo        CGGCTGATTA GTACGAAACA TTCACGCAAA CGGCGCCTCC TTATTTTTTA TCTGCATTTA CCTACACATT GGGCGAGGTC TTTACTACGG ATCTTATATA
Fonsagrada            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Castromarín           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Pto. Palo-2'         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lugo-1'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Lugo-2'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Trabada-1'           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Trabada-2'           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
'Palacios del Sil-1'  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Palacios del Sil-2'  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Arguenos-1'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Arguenos-2'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Arguenos-3'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Benasque-1'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Benasque-2'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Lanz-1'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Lanz-2'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Lindux-1'            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Lindux-2'            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Mijares-10H'         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
San_Pablo             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Mijares-2'           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
Sierra_Estrela        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Isoba-1'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Isoba-2'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Isoba-3'             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Emb. del Porma-1'    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Emb. del Porma-2'    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Lillo Bierzo-1'      .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Lillo del Bierzo-2'  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
Montseny              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
Gresigne              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
Setcasses             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Ucieda-1'            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Ucieda-2'            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Ucieda-3'            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Ucieda-4'            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
'Lillo Bierzo-101'    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
Pto._Escudo           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......C. .......... ..........
San_Mamede            .......... A......... .......... .......... .......... .......... .A.......C .......C. .......... ..........
Sintra                .......... A......... .......... .......... .......... .......... .A.......C .......C. .......... ..........
Cabezuelas            .......... A......... .......... .......... .......... .......... .A........ .......C. .......... ..........
Hervas                .......... A......... .......... .......... .......... .......... .A........ .......C. .......... ..........
Pto._ElPalo1          ...T...... .......... .......... ......T... .......... .......... ...T...... ..A.....C. .......... ..........
Circo_de_Gredos       .......... A......... .......... .......... .......... .......... ...C...... .......C. .......... ..........
Cinco_Lagunas         .......... A......... .......... .......... .......... .......... ...C...... .......C. .......... ..........
Peñalara              .......... A......... .......... .......... .......... .......... ...C...... .......C. .......... ..........
Laguna_Los_Pajaros    .......... A......... .......... .......... .......... .......... ...C...... .......C. .......... ..........
El_Hornillo           .......... A......... .......... .......... .......... .......... ...C...... .......C. .......... ..........
El_Fito               .......... .......T.. .......... .......... .......... .......... ...T...... .......C. .......... ..........
'Luarca-1H'           .......... .......... .......... T......... .......... .......... ...T...... .......C. .......... ..........
```

```
'Luarca-75H'          ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Oviedo-1'            ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Oviedo-2'            ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Oviedo-3'            ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Oviedo-4'            ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Cofiñal-69M'         ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Trabada-17M'         ...T......  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Amieva-27M'          ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Amieva-1'            ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Amieva-2'            ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ..........
'Río Oza-1'           ..........  ..........  ..........  T.........  ..........  ..........  ...T......  .....T..C.  ..........  ..........
'Río Oza-64M'         ..........  ..........  ..........  T.........  ..........  ..........  ...T......  ........C.  ..........  ......C...
'Monast. Hermo-1'     ...T......  ..........  ..........  ......T...  ..........  ..........  ...T......  ..A.....C.  ..........  ..........
'Monast. Hermo-2'     ...T......  ..........  ..........  ......T...  ..........  ..........  ...T......  ..A.....C.  ..........  ..........
'Monast. Hermo-3'     ...T......  ..........  ..........  ......T...  ..........  ..........  ...T......  ..A.....C.  ..........  ..........
'Villablinos-1'       ...T......  ..........  ..........  ......T...  ..........  ..........  ...T......  ..A.....C.  ..........  ..........
'Pto. Palo-48'        ...T......  ..........  ..........  ......T...  ..........  ..........  ...T......  ..A.....C.  ..........  ..........
'Sierra Monchique-1'  ..........  ........T.  .C........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ........C.  ..........  ..........
'Sierra Monchique-2'  ..........  ........T.  .C........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ........C.  ..........  ..........
Santiago_do_Cacem     ..........  ........T.  .C........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ........C.  ..........  ..........
Sierra_Morena         ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ........C.  ....T.....  ..........
Sierra_Aracena        ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ........C.  ....T.....  ..........
'Riópar-1'            ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ........C.  ....T.....  ..........
'Riópar-2'            ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ........C.  ....T.....  ..........
Baños_de_la_Encina    ..........  ........T.  ..........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ........C.  ....T.....  ..........
'Sierra Grazalema-1'  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ..A.....C.  .......T..  G.........
'Sierra Grazalema-2'  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ..A.....C.  .......T..  G.........
Ronda                 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ...C......  ..A.....C.  .......T..  G.........
S._atra               ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  .......C..  T..T......  ..A.....C.  .......T..  C.....C..G
S._algira             ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ......CC..  ...C..T..C  ..A.......  ..........  .........G
S._lanzai             ..........  ..........  ..........  ..........  ..C.......  .......C..  ...C......  ..A.....C.  ..........  ..........
Ch._lusitanica        ..........  A.C..T..T.  ..........  T........A  C.C.......  .T.....C..  ...T..T...  ..T.....C.  ....T.....  C..C......
M._luschani           ..........  ..G.....T.  ..........  T........A  .....C....  .......C..  ...C......  ..A..G..C.  ..........  ...C......
M._caucasica          T..T...C..  A.T..T....  .C..TAT...  T........A  ..C.......  ....T.....  ...C.....C  ..A..C....  ....T..T..  ...C......
'M. luschani-3'       ..........  ..G.....T.  ..........  T........A  .....Y..C.  .......C..  ...T......  ........C.  .......T..  .......GCG
'M. luschani-4'       ..........  ..G.....T.  ..........  T........A  .....Y..C.  .......C..  ...T......  ........C.  .......T..  ...C...GCG
'M. luschani-2'       ..........  ..G.....T.  ..........  T........A  .....C....  .......C..  ...C......  ..A..G..C.  ..........  ...C......
T._marmoratus         T......C..  ..........  .C..T..T..  ...G.....A  C....C..C.  .......C..  ..........  .....G..CT  .G........  C..C..C...

                                310         320         330         340         350         360         370
Pto._Padornelo        TATAAAGAAA  CATGAAACAT  TGGAGTAATT  TTATTATTTT  TAGTCATAGC  CACAGCCTTT  GTAGGATATG  TA
Fonsagrada            ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
Castromarín           ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..
'Pto. Palo-2'         ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  A.........  ..
'Lugo-1'              ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..
'Lugo-2'              ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..
'Trabada-1'           ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..
'Trabada-2'           ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..
'Palacios del Sil-1'  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..
'Palacios del Sil-2'  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..
'Arguenos-1'          ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
'Arguenos-2'          ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
'Arguenos-3'          ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
'Benasque-1'          ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
'Benasque-2'          ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
'Lanz-1'              ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
'Lanz-2'              ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
'Lindux-1'            ..........  ..........  ..........  ..........  ....T.....  ..........  ..........  ..
```

```
'Lindux-2'              .......... .......... .......... .......... ....T..... .......... .......... ..
'Mijares-10H'           .......... .......... .......... .......... ....T..... .......... .......... ..
San_Pablo               .......... .......... .......... .......... ....T..... .......... .......... ..
'Mijares-2'             .......... .......... .......... .......... ....T..... .......... .......... ..
Sierra_Estrela          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ??
'Isoba-1'               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Isoba-2'               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Isoba-3'               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Emb. del Porma-1'      .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Emb. del Porma-2'      .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Lillo Bierzo-1'        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Lillo del Bierzo-2'    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
Montseny                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
Gresigne                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
Setcasses               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Ucieda-1'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Ucieda-2'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Ucieda-3'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Ucieda-4'              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Lillo Bierzo-101'      .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
Pto._Escudo             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
San_Mamede              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
Sintra                  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
Cabezuelas              .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
Hervas                  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
Pto._ElPalo1            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ??
Circo_de_Gredos         .......... .......T.. .......... .......... .......... .......... .......... ..
Cinco_Lagunas           .......... .......T.. .......... .......... .......... .......... .......... ..
Peñalara                .......... .......T.. .......... .......... .......... .......... .......... ..
Laguna_Los_Pajaros      .......... .......T.. .......... .......... .......... .......... .......... ..
El_Hornillo             .......... .......T.. .......... .......... .......... .......... .......... ..
El_Fito                 .......... .......... C......... .......... .......... ?......... .........? ??
'Luarca-1H'             ....T..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Luarca-75H'            .......... .......... C......... .......... .......... T......... .......... ..
'Oviedo-1'              .......... .......... C......... .......... .......... T......... .......... ..
'Oviedo-2'              .......... .......... C......... .......... .......... T......... .......... ..
'Oviedo-3'              .......... .......... C......... .......... .......... T......... .......... ..
'Oviedo-4'              .......... .......... C......... .......... .......... T......... .......... ..
'Cofiñal-69M'           .......... .......... .......... .......... ....T..... T......... .......... ..
'Trabada-17M'           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Amieva-27M'            .......... .......... .......... .......... .......... T......... .......... ..
'Amieva-1'              .......... .......... .......... .......... .......... T......... .......... ..
'Amieva-2'              .......... .......... .......... .......... .......... T......... .......... ..
'Río Oza-1'             ....T..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Río Oza-64M'           ....T..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Monast. Hermo-1'       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Monast. Hermo-2'       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Monast. Hermo-3'       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Villablinos-1'         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Pto. Palo-48'          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..
'Sierra Monchique-1'    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........? ??
'Sierra Monchique-2'    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........? ??
Santiago_do_Cacem       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........? ??
Sierra_Morena           .......... .......... .......... .........C .......... .......... .......... ..
Sierra_Aracena          .......... .......... .......... .........C .......... .......... .......... ..
'Riópar-1'              .......... .......... .......... .........C .......... .......... .......... ..
'Riópar-2'              .......... .......... .......... .........C .......... .......... .......... ..
Baños_de_la_Encina      .......... .......... .......... .........C .......... .......... .......... ..
'Sierra Grazalema-1'    .......... .......... ...G..G..C .......... .......... .......... .......... ..
```

```
'Sierra Grazalema-2'    .......... .......... ...G..G..C .......... .......... .......... .......... ..
Ronda                   .......... .......... ...G..G..C .......... .......... .......... .......... ..
S._atra                 .......... ....G..T.. ...G..T..C .......... ....A..... .......... .......... .C
S._algira               ..C....... .......... ...G.....A ........A. ..A....... .......... ........C. ..
S._lanzai               .......... .......... ...G..T... .......... ....T..... .......... .......... ..
Ch._lusitanica          .T...G.... .......T.. .........C ...C...... ....A..... .......... ..T....... ??
M._luschani             .......... .......T.. .......... ...C...... .G..T..... .......... ..G..G..C. .C
M._caucasica            .......... .......... C..C..G..C ...C....CC .G........ ...T...... A....C..C. ..
'M. luschani-3'         .......... .......T.. .......... .........C ....T..... .......... ........C. .C
'M. luschani-4'         .......... .......T.. .......... .........C ....T..... .......... ........C. .C
'M. luschani-2'         .......... .......T.. .......... ...C...... .G..T..... ...G...... ..G..G..C. .C
T._marmoratus           .TC.....G. .C........ C..C...... C..C....C. ....T..... ...T..T... ..T..C..C. .C
```

Apéndice 2. Matriz de distancias sin corregir “p”, HKY y HKY + I + G.

Matriz de distancias ‘p’

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 Guadalupe	-													
2 Fonsagrada	0.01093	-												
3 Castromarín	0.00818	0.00270	-											
4 Pto. Padornelo	0.01344	0.00819	0.00544	-										
5 Pto. Palo-2	0.01344	0.00819	0.00544	0.00538	-									
6 Lugo-1	0.01075	0.00550	0.00275	0.00269	0.00269	-								
7 Lugo-2	0.01075	0.00550	0.00275	0.00269	0.00269	0.00000	-							
8 Trabada-1	0.01075	0.00550	0.00275	0.00269	0.00269	0.00000	0.00000	-						
9 Trabada-2	0.01075	0.00550	0.00275	0.00269	0.00269	0.00000	0.00000	0.00000	-					
10 Palacios del Sil	0.00806	0.00824	0.00550	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	-				
11 Palacios del Sil	0.00806	0.00824	0.00550	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00000	-			
12 Arguenos-1	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	-		
13 Arguenos-2	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00000	-	
14 Arguenos-3	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	-
15 Benasque-1	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000
16 Benasque-2	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000
17 Lanz-1	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000
18 Lanz-2	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000
19 Lindux-1	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000
20 Lindux-2	0.00806	0.00824	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000
21 Mijares-10H	0.00806	0.00824	0.01093	0.01613	0.01613	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.00538	0.00538	0.00538
22 San Pablo	0.00538	0.00550	0.00819	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00269	0.00269	0.00269
23 Mijares-2	0.00538	0.00550	0.00819	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00269	0.00269	0.00269
24 Sierra Estrela	0.00811	0.01377	0.01100	0.01082	0.01082	0.00811	0.00811	0.00811	0.00811	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540
25 Isoba-1	0.00806	0.01368	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538
26 Isoba-2	0.00806	0.01368	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538
27 Isoba-3	0.00806	0.01368	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538
28 Emb. del Porma-1	0.00806	0.01368	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538
29 Emb. del Porma-2	0.00806	0.01368	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538
30 Lillo Bierzo-1	0.00806	0.01368	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538
31 Lillo del Bierzo	0.00806	0.01368	0.01093	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538
32 Montseny	0.01075	0.01637	0.01362	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
33 Gresigne	0.01075	0.01637	0.01362	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
34 Setcasses	0.01075	0.01637	0.01362	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
35 Ucieda-1	0.00538	0.01099	0.00824	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
36 Ucieda-2	0.00538	0.01099	0.00824	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
37 Ucieda-3	0.00538	0.01099	0.00824	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
38 Ucieda-4	0.00538	0.01099	0.00824	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
39 Lillo Bierzo-101	0.00538	0.01099	0.00824	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
40 Pto. Escudo	0.00538	0.01099	0.00824	0.00806	0.00806	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
41 San Mamede	0.01344	0.01911	0.01637	0.01613	0.01613	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075
42 Sintra	0.01344	0.01911	0.01637	0.01613	0.01613	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075
43 Cabezuelas	0.01075	0.01637	0.01362	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
44 Hervas	0.01075	0.01637	0.01362	0.01344	0.01344	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
45 Pto. ElPalo1	0.02185	0.02712	0.02439	0.03003	0.03003	0.02731	0.02731	0.02731	0.02731	0.02460	0.02460	0.02460	0.02460	0.02460
46 Circo de Gredos	0.01344	0.01906	0.01631	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
47 Cinco Lagunas	0.01344	0.01906	0.01631	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
48 Peñalara	0.01344	0.01906	0.01631	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
49 Laguna Los Pajar	0.01344	0.01906	0.01631	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
50 El Hornillo	0.01344	0.01906	0.01631	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
51 El Fito	0.02196	0.02183	0.01911	0.02468	0.02468	0.02197	0.02197	0.02197	0.02197	0.01925	0.01925	0.02474	0.02474	0.02474
52 Luarca-1H	0.01613	0.02169	0.01894	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
53 Luarca-75H	0.01613	0.02175	0.01900	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
54 Oviedo-1	0.01882	0.02988	0.02713	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
55 Oviedo-2	0.01882	0.02988	0.02713	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
56 Oviedo-3	0.01882	0.02988	0.02713	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
57 Oviedo-4	0.01882	0.02988	0.02713	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
58 Cofiñal-69M	0.02419	0.02438	0.02707	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02151	0.02151	0.02151
59 Trabada-17M	0.01882	0.02438	0.02163	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
60 Amieva-27M	0.02151	0.02713	0.02438	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419
61 Amieva-1	0.01613	0.02175	0.01900	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
62 Amieva-2	0.01613	0.02175	0.01900	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
63 Río Oza-1	0.01882	0.02438	0.02163	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
64 Río Oza-64M	0.01613	0.02175	0.01900	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
65 Monast. Hermo-1	0.02419	0.02976	0.02701	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
66 Monast. Hermo-2	0.02419	0.02976	0.02701	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
67 Monast. Hermo-3	0.02419	0.02976	0.02701	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
68 Villablinos-1	0.02419	0.02976	0.02701	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
69 Pto. Palo-48	0.02419	0.02976	0.02701	0.03226	0.03226	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
70 Sierra Monchique	0.02160	0.02738	0.02461	0.02971	0.02971	0.02700	0.02700	0.02700	0.02700	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429
71 Sierra Monchique	0.02160	0.02738	0.02461	0.02971	0.02971	0.02700	0.02700	0.02700	0.02700	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429
72 Santiago do Cace	0.02160	0.02738	0.02461	0.02971	0.02971	0.02700	0.02700	0.02700	0.02700	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429
73 Sierra Morena	0.02151	0.02724	0.02450	0.02957	0.02957	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419
74 Sierra Aracena	0.01882	0.02450	0.02175	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
75 Riópar-1	0.01882	0.02450	0.02175	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
76 Riópar-2	0.01882	0.02450	0.02175	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
77 Baños de la Enci	0.01882	0.02450	0.02175	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
78 Sierra Grazalema	0.04032	0.04612	0.04337	0.04839	0.04839	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301
79 Sierra Grazalema	0.04032	0.04612	0.04337	0.04839	0.04839	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301
80 Ronda	0.04301	0.04881	0.04606	0.05108	0.05108	0.04839	0.04839	0.04839	0.04839	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570
81 S. atra	0.06452	0.06789	0.06789	0.06720	0.06720	0.06452	0.06452	0.06452	0.06452	0.06183	0.06183	0.05914	0.05914	0.05914
82 S. algira	0.09749	0.09730	0.09459	0.09476	0.09475	0.09206	0.09206	0.09206	0.09206	0.09480	0.09480	0.09480	0.09480	0.09480
83 S. lanzai	0.04301	0.04895	0.05164	0.05108	0.05108	0.04839	0.04839	0.04839	0.04839	0.04570	0.04570	0.04032	0.04032	0.04032
84 Ch. lusitanica	0.17561	0.17434	0.17432	0.17292	0.17292	0.17021	0.17021	0.17021	0.17021	0.16750	0.16750	0.17022	0.17022	0.17022
85 T. marmoratus	0.21237	0.20884	0.21153	0.20430	0.20968	0.20699	0.20699	0.20699	0.20699	0.20430	0.20430	0.20430	0.20430	0.20430
86 M. luschani	0.12097	0.12204	0.12473	0.12366	0.12903	0.12634	0.12634	0.12634	0.12634	0.12366	0.12366	0.11828	0.11828	0.11828
87 M. caucasica	0.20161	0.20332	0.20057	0.19892	0.19355	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19892	0.19892	0.19892	0.19892	0.19892
88 Eu. asper	0.18280	0.18436	0.18162	0.18011	0.18011	0.17742	0.17742	0.17742	0.17742	0.17473	0.17473	0.18011	0.18011	0.18011
89 M. luschani-3	0.11320	0.10879	0.11148	0.11053	0.11051	0.10782	0.10782	0.10782	0.10782	0.10511	0.10511	0.10511	0.10511	0.10511
90 M. luschani-4	0.11591	0.11154	0.11424	0.11324	0.11322	0.11053	0.11053	0.11053	0.11053	0.10783	0.10783	0.10783	0.10783	0.10783
91 M. luschani-2	0.12634	0.12743	0.13012	0.12903	0.13441	0.13172	0.13172	0.13172	0.13172	0.12903	0.12903	0.12366	0.12366	0.12366

Matriz de distancias 'p' (continuación)

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
15 Benasque-1	-													
16 Benasque-2	0.00000	-												
17 Lanz-1	0.00000	0.00000	-											
18 Lanz-2	0.00000	0.00000	0.00000	-										
19 Lindux-1	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-									
20 Lindux-2	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-								
21 Mijares-10H	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	-							
22 San Pablo	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	-						
23 Mijares-2	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00000	-					
24 Sierra Estrela	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.01080	0.00811	0.00811	-				
25 Isoba-1	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.01075	0.00806	0.00806	0.00540	-			
26 Isoba-2	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.01075	0.00806	0.00806	0.00540	0.00000	-		
27 Isoba-3	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.01075	0.00806	0.00806	0.00540	0.00000	0.00000	-	
28 Emb. del Porma-1	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.01075	0.00806	0.00806	0.00540	0.00000	0.00000	0.00000	-
29 Emb. del Porma-2	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.01075	0.00806	0.00806	0.00540	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
30 Lillo Bierzo-1	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.01075	0.00806	0.00806	0.00540	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
31 Lillo del Bierzo	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.01075	0.00806	0.00806	0.00540	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
32 Montseny	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.01344	0.01075	0.01075	0.00811	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
33 Gresigne	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.01344	0.01075	0.01075	0.00811	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
34 Setcasses	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.01344	0.01075	0.01075	0.00811	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
35 Ucieda-1	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00806	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
36 Ucieda-2	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00806	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
37 Ucieda-3	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00806	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
38 Ucieda-4	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00806	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
39 Lillo Bierzo-101	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00806	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
40 Pto. Escudo	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00806	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
41 San Mamede	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.01613	0.01344	0.01344	0.01080	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075
42 Sintra	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075	0.01613	0.01344	0.01344	0.01080	0.01075	0.01075	0.01075	0.01075
43 Cabezuelas	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.01344	0.01075	0.01075	0.00811	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
44 Hervas	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.01344	0.01075	0.01075	0.00811	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806
45 Pto. ElPalol	0.02460	0.02460	0.02460	0.02460	0.02460	0.02460	0.02460	0.02185	0.02185	0.02468	0.02460	0.02460	0.02460	0.02460
46 Circo de Gredos	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01344	0.01344	0.01622	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
47 Cinco Lagunas	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01344	0.01344	0.01622	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
48 Peñalara	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01344	0.01344	0.01622	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
49 Laguna Los Pajar	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01344	0.01344	0.01622	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
50 El Hornillo	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01344	0.01344	0.01622	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613
51 El Fito	0.02474	0.02474	0.02474	0.02474	0.02474	0.02474	0.02474	0.02197	0.02197	0.02478	0.02474	0.02474	0.02474	0.02474
52 Luarca-1H	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01895	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
53 Luarca-75H	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01893	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
54 Oviedo-1	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02704	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
55 Oviedo-2	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02704	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
56 Oviedo-3	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02704	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
57 Oviedo-4	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02704	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
58 Cofiñal-69M	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.02703	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
59 Trabada-17M	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.02166	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
60 Amieva-27M	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02432	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419
61 Amieva-1	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01893	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
62 Amieva-2	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01893	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
63 Rio Oza-1	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.02166	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
64 Rio Oza-64M	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01613	0.01613	0.01893	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882
65 Monast. Hermo-1	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02708	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
66 Monast. Hermo-2	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02708	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
67 Monast. Hermo-3	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02708	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
68 Villablinos-1	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02708	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
69 Pto. Palo-48	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02419	0.02419	0.02708	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688
70 Sierra Monchique	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02160	0.02160	0.02432	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429
71 Sierra Monchique	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02160	0.02160	0.02432	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429
72 Santiago do Cace	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429	0.02160	0.02160	0.02432	0.02429	0.02429	0.02429	0.02429
73 Sierra Morena	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02151	0.02151	0.02431	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419
74 Sierra Aracena	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.02162	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
75 Riópar-1	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.02162	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
76 Riópar-2	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.02162	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
77 Baños de la Enci	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01882	0.01882	0.02162	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151
78 Sierra Grazalema	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04032	0.04032	0.04318	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301
79 Sierra Grazalema	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04032	0.04032	0.04318	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301
80 Ronda	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04301	0.04301	0.04589	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570
81 S. atra	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.06452	0.06183	0.06183	0.05955	0.06183	0.06183	0.06183	0.06183
82 S. algira	0.09480	0.09480	0.09480	0.09480	0.09480	0.09480	0.10024	0.09750	0.09750	0.09521	0.09480	0.09480	0.09480	0.09480
83 S. lanzai	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04570	0.04301	0.04301	0.04587	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570
84 Ch. lusitanica	0.17022	0.17022	0.17022	0.17022	0.17022	0.17022	0.17562	0.17292	0.17292	0.16757	0.17290	0.17290	0.17290	0.17290
85 T. marmoratus	0.20430	0.20430	0.20430	0.20430	0.20430	0.20430	0.20968	0.20699	0.20699	0.20844	0.20968	0.20968	0.20968	0.20968
86 M. luschani	0.11828	0.11828	0.11828	0.11828	0.11828	0.11828	0.11828	0.11559	0.11559	0.11630	0.11828	0.11828	0.11828	0.11828
87 M. caucasica	0.19892	0.19892	0.19892	0.19892	0.19892	0.19892	0.20430	0.20161	0.20161	0.19989	0.19355	0.19355	0.19355	0.19355
88 Eu. asper	0.18011	0.18011	0.18011	0.18011	0.18011	0.18011	0.18548	0.18280	0.18280	0.17847	0.17473	0.17473	0.17473	0.17473
89 M. luschani-3	0.10511	0.10511	0.10511	0.10511	0.10511	0.10511	0.11051	0.10782	0.10782	0.10309	0.11049	0.11049	0.11049	0.11049
90 M. luschani-4	0.10783	0.10783	0.10783	0.10783	0.10783	0.10783	0.11322	0.11053	0.11053	0.10583	0.11320	0.11320	0.11320	0.11320
91 M. luschani-2	0.12366	0.12366	0.12366	0.12366	0.12366	0.12366	0.12366	0.12097	0.12097	0.12168	0.12366	0.12366	0.12366	0.12366

Matriz de distancias 'p' (continuación)

	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
29 Emb. del Porma-2	-													
30 Lillo Bierzo-1	0.00000	-												
31 Lillo del Bierzo	0.00000	0.00000	-											
32 Montseny	0.00806	0.00806	0.00806	-										
33 Gresigne	0.00806	0.00806	0.00806	0.00000	-									
34 Setcasses	0.00806	0.00806	0.00806	0.00000	0.00000	-								
35 Ucieda-1	0.00269	0.00269	0.00269	0.00538	0.00538	0.00538	-							
36 Ucieda-2	0.00269	0.00269	0.00269	0.00538	0.00538	0.00538	0.00000	-						
37 Ucieda-3	0.00269	0.00269	0.00269	0.00538	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	-					
38 Ucieda-4	0.00269	0.00269	0.00269	0.00538	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000	-				
39 Lillo Bierzo-101	0.00269	0.00269	0.00269	0.00538	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-			
40 Pto. Escudo	0.00269	0.00269	0.00269	0.00538	0.00538	0.00538	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-		
41 San Mamede	0.01075	0.01075	0.01075	0.01344	0.01344	0.01344	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	-	
42 Sintra	0.01075	0.01075	0.01075	0.01344	0.01344	0.01344	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00806	0.00000	-
43 Cabezuelas	0.00806	0.00806	0.00806	0.01075	0.01075	0.01075	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269
44 Hervas	0.00806	0.00806	0.00806	0.01075	0.01075	0.01075	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00538	0.00269	0.00269
45 Pto. ElPalol	0.02460	0.02460	0.02460	0.02731	0.02731	0.02731	0.02188	0.02188	0.02188	0.02188	0.02188	0.02188	0.03006	0.03006
46 Circo de Gredos	0.01613	0.01613	0.01613	0.01882	0.01882	0.01882	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01613	0.01613
47 Cinco Lagunas	0.01613	0.01613	0.01613	0.01882	0.01882	0.01882	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01613	0.01613
48 Peñalara	0.01613	0.01613	0.01613	0.01882	0.01882	0.01882	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01613	0.01613
49 Laguna Los Pajar	0.01613	0.01613	0.01613	0.01882	0.01882	0.01882	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01613	0.01613
50 El Hornillo	0.01613	0.01613	0.01613	0.01882	0.01882	0.01882	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01344	0.01613	0.01613
51 El Fito	0.02474	0.02474	0.02474	0.02746	0.02746	0.02746	0.02203	0.02203	0.02203	0.02203	0.02203	0.02203	0.03023	0.03023
52 Luarca-1H	0.01882	0.01882	0.01882	0.02151	0.02151	0.02151	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02419	0.02419
53 Luarca-75H	0.01882	0.01882	0.01882	0.02151	0.02151	0.02151	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02419	0.02419
54 Oviedo-1	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
55 Oviedo-2	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
56 Oviedo-3	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
57 Oviedo-4	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
58 Cofiñal-69M	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
59 Trabada-17M	0.02151	0.02151	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.02688	0.02688
60 Amieva-27M	0.02419	0.02419	0.02419	0.02688	0.02688	0.02688	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02957	0.02957
61 Amieva-1	0.01882	0.01882	0.01882	0.02151	0.02151	0.02151	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02419	0.02419
62 Amieva-2	0.01882	0.01882	0.01882	0.02151	0.02151	0.02151	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02419	0.02419
63 Rio Oza-1	0.02151	0.02151	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.02688	0.02688
64 Rio Oza-64M	0.01882	0.01882	0.01882	0.02151	0.02151	0.02151	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02419	0.02419
65 Monast. Hermo-1	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
66 Monast. Hermo-2	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
67 Monast. Hermo-3	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
68 Villablinos-1	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
69 Pto. Palo-48	0.02688	0.02688	0.02688	0.02957	0.02957	0.02957	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.03226	0.03226
70 Sierra Monchique	0.02429	0.02429	0.02429	0.02700	0.02700	0.02700	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02969	0.02969
71 Sierra Monchique	0.02429	0.02429	0.02429	0.02700	0.02700	0.02700	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02969	0.02969
72 Santiago do Cace	0.02429	0.02429	0.02429	0.02700	0.02700	0.02700	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02158	0.02969	0.02969
73 Sierra Morena	0.02419	0.02419	0.02419	0.02688	0.02688	0.02688	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02957	0.02957
74 Sierra Aracena	0.02151	0.02151	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.02688	0.02688
75 Riópar-1	0.02151	0.02151	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.02688	0.02688
76 Riópar-2	0.02151	0.02151	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.02688	0.02688
77 Baños de la Encí	0.02151	0.02151	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.02688	0.02688
78 Sierra Grazalema	0.04301	0.04301	0.04301	0.04570	0.04570	0.04570	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04839	0.04839
79 Sierra Grazalema	0.04301	0.04301	0.04301	0.04570	0.04570	0.04570	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04032	0.04839	0.04839
80 Ronda	0.04570	0.04570	0.04570	0.04839	0.04839	0.04839	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.05108	0.05108
81 S. atra	0.06183	0.06183	0.06183	0.06452	0.06452	0.06452	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.06720	0.06720
82 S. algira	0.09480	0.09480	0.09480	0.09750	0.09750	0.09750	0.09211	0.09211	0.09211	0.09211	0.09211	0.09211	0.09479	0.09479
83 S. lanzai	0.04570	0.04570	0.04570	0.04839	0.04839	0.04839	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.05108	0.05108
84 Ch. lusitanica	0.17290	0.17290	0.17290	0.17021	0.17021	0.17021	0.17020	0.17020	0.17020	0.17020	0.17020	0.17020	0.17290	0.17290
85 T. marmoratus	0.20968	0.20968	0.20968	0.20699	0.20699	0.20699	0.20699	0.20699	0.20699	0.20699	0.20699	0.20699	0.21505	0.21505
86 M. luschani	0.11828	0.11828	0.11828	0.12097	0.12097	0.12097	0.12097	0.12097	0.12097	0.12097	0.12097	0.12097	0.12903	0.12903
87 M. caucasica	0.19355	0.19355	0.19355	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19355	0.19355
88 Eu. asper	0.17473	0.17473	0.17473	0.18280	0.18280	0.18280	0.17742	0.17742	0.17742	0.17742	0.17742	0.17742	0.18548	0.18548
89 M. luschani-3	0.11049	0.11049	0.11049	0.10782	0.10782	0.10782	0.10780	0.10780	0.10780	0.10780	0.10780	0.10780	0.11587	0.11587
90 M. luschani-4	0.11320	0.11320	0.11320	0.11053	0.11053	0.11053	0.11052	0.11052	0.11052	0.11052	0.11052	0.11052	0.11858	0.11858
91 M. luschani-2	0.12366	0.12366	0.12366	0.12634	0.12634	0.12634	0.12634	0.12634	0.12634	0.12634	0.12634	0.12634	0.13441	0.13441

Matriz de distancias 'p' (continuación)

	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
43 Cabezuelas	-													
44 Hervas	0.00000	-												
45 Pto. ElPalol	0.02731	0.02731	-											
46 Circo de Gredos	0.01344	0.01344	0.02731	-										
47 Cinco Lagunas	0.01344	0.01344	0.02731	0.00000	-									
48 Peñalara	0.01344	0.01344	0.02731	0.00000	0.00000	-								
49 Laguna Los Pajar	0.01344	0.01344	0.02731	0.00000	0.00000	0.00000	-							
50 El Hornillo	0.01344	0.01344	0.02731	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-						
51 El Fito	0.02746	0.02746	0.02727	0.02197	0.02197	0.02197	0.02197	0.02197	-					
52 Luarca-1H	0.02151	0.02151	0.01636	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02190	-				
53 Luarca-75H	0.02151	0.02151	0.02186	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.00821	0.01613	-			
54 Oviedo-1	0.02957	0.02957	0.03003	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.00546	0.02419	0.00806	-		
55 Oviedo-2	0.02957	0.02957	0.03003	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.00546	0.02419	0.00806	0.00000	-	
56 Oviedo-3	0.02957	0.02957	0.03003	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.00546	0.02419	0.00806	0.00000	0.00000	-
57 Oviedo-4	0.02957	0.02957	0.03003	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.00546	0.02419	0.00806	0.00000	0.00000	0.00000
58 Cofiñal-69M	0.02957	0.02957	0.02997	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02190	0.02419	0.01344	0.02151	0.02151	0.02151
59 Trabada-17M	0.02419	0.02419	0.00815	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02419	0.02462	0.01344	0.01882	0.02688	0.02688	0.02688
60 Amieva-27M	0.02688	0.02688	0.02726	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.02688	0.01917	0.02151	0.01075	0.01882	0.01882	0.01882
61 Amieva-1	0.02151	0.02151	0.02185	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01369	0.01613	0.00538	0.01344	0.01344	0.01344
62 Amieva-2	0.02151	0.02151	0.02185	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.01369	0.01613	0.00538	0.01344	0.01344	0.01344
63 Rio Oza-1	0.02419	0.02419	0.02453	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02183	0.00806	0.01882	0.02419	0.02419	0.02419
64 Rio Oza-64M	0.02151	0.02151	0.02185	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02151	0.02196	0.00538	0.01613	0.02419	0.02419	0.02419
65 Monast. Hermo-1	0.02957	0.02957	0.00271	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.03004	0.01882	0.02419	0.03226	0.03226	0.03226
66 Monast. Hermo-2	0.02957	0.02957	0.00271	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.03004	0.01882	0.02419	0.03226	0.03226	0.03226
67 Monast. Hermo-3	0.02957	0.02957	0.00271	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.03004	0.01882	0.02419	0.03226	0.03226	0.03226
68 Villablinos-1	0.02957	0.02957	0.00271	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.03004	0.01882	0.02419	0.03226	0.03226	0.03226
69 Pto. Palo-48	0.02957	0.02957	0.00271	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.02957	0.03004	0.01882	0.02419	0.03226	0.03226	0.03226
70 Sierra Monchique	0.02700	0.02700	0.03286	0.01891	0.01891	0.01891	0.01891	0.01891	0.02485	0.02972	0.02430	0.02702	0.02702	0.02702
71 Sierra Monchique	0.02700	0.02700	0.03286	0.01891	0.01891	0.01891	0.01891	0.01891	0.02485	0.02972	0.02430	0.02702	0.02702	0.02702
72 Santiago do Cace	0.02700	0.02700	0.03286	0.01891	0.01891	0.01891	0.01891	0.01891	0.02485	0.02972	0.02430	0.02702	0.02702	0.02702
73 Sierra Morena	0.02688	0.02688	0.03552	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.01882	0.02474	0.02957	0.02419	0.02688	0.02688	0.02688
74 Sierra Aracena	0.02419	0.02419	0.03277	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02197	0.02688	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419
75 Riópar-1	0.02419	0.02419	0.03277	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02197	0.02688	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419
76 Riópar-2	0.02419	0.02419	0.03277	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02197	0.02688	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419
77 Baños de la Encí	0.02419	0.02419	0.03277	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.01613	0.02197	0.02688	0.02151	0.02419	0.02419	0.02419
78 Sierra Grazalema	0.04570	0.04570	0.04904	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.05488	0.04839	0.04839	0.05645	0.05645	0.05645
79 Sierra Grazalema	0.04570	0.04570	0.04904	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.04301	0.05488	0.04839	0.04839	0.05645	0.05645	0.05645
80 Ronda	0.04839	0.04839	0.05175	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.05759	0.05108	0.05108	0.05914	0.05914	0.05914
81 S. atra	0.06452	0.06452	0.06855	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.06894	0.06989	0.06989	0.07258	0.07258	0.07258
82 S. algira	0.09749	0.09749	0.10036	0.10019	0.10019	0.10019	0.10019	0.10019	0.10660	0.10014	0.10020	0.10832	0.10832	0.10832
83 S. lanzai	0.04839	0.04839	0.05732	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.04570	0.05769	0.05645	0.05645	0.05376	0.05376	0.05376
84 Ch. lusitanica	0.17021	0.17021	0.17721	0.16752	0.16752	0.16752	0.16752	0.16752	0.16438	0.17023	0.17021	0.17023	0.17023	0.17023
85 T. marmoratus	0.21237	0.21237	0.22397	0.21774	0.21774	0.21774	0.21774	0.21774	0.21145	0.21774	0.21237	0.21774	0.21774	0.21774
86 M. luschani	0.12634	0.12634	0.12841	0.11559	0.11559	0.11559	0.11559	0.11559	0.12634	0.12366	0.12366	0.12903	0.12903	0.12903
87 M. caucasica	0.19624	0.19624	0.19884	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.20540	0.19892	0.19892	0.20430	0.20430	0.20430
88 Eu. asper	0.18280	0.18280	0.19099	0.18817	0.18817	0.18817	0.18817	0.18817	0.18353	0.19355	0.18548	0.19086	0.19086	0.19086
89 M. luschani-3	0.11318	0.11318	0.12334	0.11051	0.11051	0.11051	0.11051	0.11051	0.11025	0.11324	0.11324	0.11862	0.11862	0.11862
90 M. luschani-4	0.11589	0.11589	0.12613	0.11322	0.11322	0.11322	0.11322	0.11322	0.11306	0.11595	0.11595	0.12133	0.12133	0.12133
91 M. luschani-2	0.13172	0.13172	0.13381	0.12097	0.12097	0.12097	0.12097	0.12097	0.13178	0.12903	0.12903	0.13441	0.13441	0.13441

Matriz de distancias 'p' (continuación)

	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
57 Oviedo-4	-													
58 Cofiñal-69M	0.02151	-												
59 Trabada-17M	0.02688	0.02688	-											
60 Amieva-27M	0.01882	0.00269	0.02419	-										
61 Amieva-1	0.01344	0.00806	0.01882	0.00538	-									
62 Amieva-2	0.01344	0.00806	0.01882	0.00538	0.00000	-								
63 Rio Oza-1	0.02419	0.02688	0.02151	0.02419	0.01882	0.01882	-							
64 Rio Oza-64M	0.02419	0.02419	0.01882	0.02151	0.01613	0.01613	0.00806	-						
65 Monast. Hermo-1	0.03226	0.03226	0.00538	0.02957	0.02419	0.02419	0.02688	0.02419	-					
66 Monast. Hermo-2	0.03226	0.03226	0.00538	0.02957	0.02419	0.02419	0.02688	0.02419	0.00000	-				
67 Monast. Hermo-3	0.03226	0.03226	0.00538	0.02957	0.02419	0.02419	0.02688	0.02419	0.00000	0.00000	-			
68 Villablinos-1	0.03226	0.03226	0.00538	0.02957	0.02419	0.02419	0.02688	0.02419	0.00000	0.00000	0.00000	-		
69 Pto. Palo-48	0.03226	0.03226	0.00538	0.02957	0.02419	0.02419	0.02688	0.02419	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
70 Sierra Monchique	0.02702	0.03246	0.02974	0.02975	0.02430	0.02430	0.02975	0.02970	0.03516	0.03516	0.03516	0.03516	0.03516	-
71 Sierra Monchique	0.02702	0.03246	0.02974	0.02975	0.02430	0.02430	0.02975	0.02970	0.03516	0.03516	0.03516	0.03516	0.03516	0.00000
72 Santiago do Cace	0.02702	0.03246	0.02974	0.02975	0.02430	0.02430	0.02975	0.02970	0.03516	0.03516	0.03516	0.03516	0.03516	0.00000
73 Sierra Morena	0.02688	0.03226	0.03226	0.02957	0.02419	0.02419	0.02957	0.02957	0.03763	0.03763	0.03763	0.03763	0.03763	0.02159
74 Sierra Aracena	0.02419	0.02957	0.02957	0.02688	0.02151	0.02151	0.02688	0.02688	0.03495	0.03495	0.03495	0.03495	0.03495	0.01891
75 Riópar-1	0.02419	0.02957	0.02957	0.02688	0.02151	0.02151	0.02688	0.02688	0.03495	0.03495	0.03495	0.03495	0.03495	0.01891
76 Riópar-2	0.02419	0.02957	0.02957	0.02688	0.02151	0.02151	0.02688	0.02688	0.03495	0.03495	0.03495	0.03495	0.03495	0.01891
77 Baños de la Enci	0.02419	0.02957	0.02957	0.02688	0.02151	0.02151	0.02688	0.02688	0.03495	0.03495	0.03495	0.03495	0.03495	0.01891
78 Sierra Grazalema	0.05645	0.05645	0.05108	0.05376	0.04839	0.04839	0.05108	0.04839	0.05108	0.05108	0.05108	0.05108	0.05108	0.05147
79 Sierra Grazalema	0.05645	0.05645	0.05108	0.05376	0.04839	0.04839	0.05108	0.04839	0.05108	0.05108	0.05108	0.05108	0.05108	0.05147
80 Ronda	0.05914	0.05914	0.05376	0.05645	0.05108	0.05108	0.05376	0.05108	0.05376	0.05376	0.05376	0.05376	0.05376	0.05418
81 S. atra	0.07258	0.07527	0.07258	0.07527	0.06989	0.06989	0.06989	0.06452	0.07258	0.07258	0.07258	0.07258	0.07258	0.07061
82 S. algira	0.10832	0.10828	0.10285	0.10558	0.10020	0.10020	0.10283	0.10019	0.10285	0.10285	0.10285	0.10285	0.10285	0.10913
83 S. lanzai	0.05376	0.05914	0.05914	0.06183	0.05645	0.05645	0.05645	0.05645	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.05914	0.05406
84 Ch. lusitanica	0.17023	0.16754	0.17024	0.16752	0.16481	0.16481	0.16754	0.17021	0.17297	0.17297	0.17297	0.17297	0.17297	0.17594
85 T. marmoratus	0.21774	0.21774	0.21505	0.22043	0.21774	0.21774	0.21237	0.21237	0.22043	0.22043	0.22043	0.22043	0.22043	0.21422
86 M. luschani	0.12903	0.12634	0.13172	0.12903	0.12366	0.12366	0.11828	0.12366	0.13172	0.13172	0.13172	0.13172	0.13172	0.12207
87 M. caucasica	0.20430	0.20968	0.19355	0.20699	0.20161	0.20161	0.19355	0.19892	0.19355	0.19355	0.19355	0.19355	0.19355	0.18940
88 Eu. asper	0.19086	0.19355	0.19355	0.19086	0.18817	0.18817	0.18817	0.18817	0.19355	0.19355	0.19355	0.19355	0.19355	0.18428
89 M. luschani-3	0.11862	0.10517	0.12136	0.10786	0.10786	0.10786	0.11053	0.11322	0.12676	0.12676	0.12676	0.12676	0.12676	0.11704
90 M. luschani-4	0.12133	0.10788	0.12407	0.11057	0.11057	0.11057	0.11324	0.11593	0.12947	0.12947	0.12947	0.12947	0.12947	0.11978
91 M. luschani-2	0.13441	0.12903	0.13710	0.13172	0.12903	0.12903	0.12366	0.12903	0.13710	0.13710	0.13710	0.13710	0.13710	0.12750

Matriz de distancias 'p' (continuación)

	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
71 Sierra Monchique	-													
72 Santiago do Cace	0.00000	-												
73 Sierra Morena	0.02159	0.02159	-											
74 Sierra Aracena	0.01891	0.01891	0.00269	-										
75 Riópar-1	0.01891	0.01891	0.00269	0.00000	-									
76 Riópar-2	0.01891	0.01891	0.00269	0.00000	0.00000	-								
77 Baños de la Enci	0.01891	0.01891	0.00269	0.00000	0.00000	0.00000	-							
78 Sierra Grazalema	0.05147	0.05147	0.05108	0.04839	0.04839	0.04839	0.04839	-						
79 Sierra Grazalema	0.05147	0.05147	0.05108	0.04839	0.04839	0.04839	0.04839	0.00000	-					
80 Ronda	0.05418	0.05418	0.05376	0.05108	0.05108	0.05108	0.05108	0.00269	0.00269	-				
81 S. atra	0.07061	0.07061	0.07258	0.06989	0.06989	0.06989	0.06989	0.06452	0.06452	0.06720	-			
82 S. algira	0.10913	0.10913	0.10294	0.10563	0.10563	0.10563	0.10563	0.10024	0.10024	0.10293	0.10307	-		
83 S. lanzai	0.05406	0.05406	0.05376	0.05108	0.05108	0.05108	0.05108	0.05914	0.05914	0.06183	0.05376	0.08675	-	
84 Ch. lusitanica	0.17594	0.17594	0.16752	0.17023	0.17023	0.17023	0.17023	0.18638	0.18638	0.18909	0.17577	0.18513	0.16748	-
85 T. marmoratus	0.21422	0.21422	0.21774	0.22043	0.22043	0.22043	0.22043	0.22312	0.22312	0.22043	0.21774	0.21679	0.21774	0.20018
86 M. luschani	0.12207	0.12207	0.11559	0.11828	0.11828	0.11828	0.11828	0.13978	0.13978	0.14247	0.13978	0.15447	0.11290	0.15682
87 M. caucasica	0.18940	0.18940	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19624	0.19892	0.20161	0.19233	0.19086	0.20262
88 Eu. asper	0.18428	0.18428	0.18280	0.18548	0.18548	0.18548	0.18548	0.19355	0.19355	0.19624	0.19086	0.21953	0.19086	0.20818
89 M. luschani-3	0.11704	0.11704	0.11051	0.10782	0.10782	0.10782	0.10782	0.12935	0.12935	0.13204	0.10507	0.14397	0.10769	0.14637
90 M. luschani-4	0.11978	0.11978	0.11322	0.11053	0.11053	0.11053	0.11053	0.13207	0.13207	0.13475	0.10778	0.14673	0.11041	0.14365
91 M. luschani-2	0.12750	0.12750	0.12097	0.12366	0.12366	0.12366	0.12366	0.14516	0.14516	0.14785	0.14516	0.15986	0.11828	0.15680

Matriz de distancias 'p' (continuación)

	85	86	87	88	89	90	91
85 T. marmoratus	-						
86 M. luschani	0.19892	-					
87 M. caucasica	0.21774	0.20430	-				
88 Eu. asper	0.17473	0.20430	0.22581	-			
89 M. luschani-3	0.20502	0.09442	0.20215	0.20492	-		
90 M. luschani-4	0.20231	0.09171	0.19946	0.20492	0.00270	-	
91 M. luschani-2	0.19624	0.00538	0.20699	0.20161	0.09709	0.09437	-

Matriz de distancia HKY

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Guadalupe	-													
2	Fonsagrada	0.01106	-												
3	Castromar?n	0.00826	0.00271	-											
4	Pto. Padornelo	0.01364	0.00826	0.00547	-										
5	Pto._Palo-2	0.01364	0.00826	0.00547	0.00541	-									
6	Lugo-1	0.01088	0.00553	0.00276	0.00270	0.00270	-								
7	Lugo-2	0.01088	0.00553	0.00276	0.00270	0.00270	0.00000	-							
8	Trabada-1	0.01088	0.00553	0.00276	0.00270	0.00270	0.00000	0.00000	-						
9	Trabada-2	0.01088	0.00553	0.00276	0.00270	0.00270	0.00000	0.00000	0.00000	-					
10	Palacios_del_Sil	0.00814	0.00832	0.00553	0.00541	0.00541	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	-				
11	Palacios_del_Sil	0.00814	0.00832	0.00553	0.00541	0.00541	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00000	-			
12	Arguenos-1	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	-		
13	Arguenos-2	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00000	-	
14	Arguenos-3	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	-
15	Benasque-1	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000
16	Benasque-2	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000
17	Lanz-1	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000
18	Lanz-2	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000
19	Lindux-1	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000
20	Lindux-2	0.00814	0.00832	0.01106	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000
21	Mijares-10H	0.00812	0.00830	0.01103	0.01637	0.01637	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01085	0.01085	0.00540	0.00540	0.00540
22	San Pablo	0.00541	0.00553	0.00826	0.01364	0.01364	0.01088	0.01088	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00270	0.00270	0.00270
23	Mijares-2	0.00541	0.00553	0.00826	0.01364	0.01364	0.01088	0.01088	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00270	0.00270	0.00270
24	Sierra Estrela	0.00818	0.01398	0.01113	0.01095	0.01095	0.00818	0.00818	0.00818	0.00818	0.00543	0.00543	0.00543	0.00543	0.00543
25	Isoba-1	0.00812	0.01385	0.01103	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540
26	Isoba-2	0.00812	0.01385	0.01103	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540
27	Isoba-3	0.00812	0.01385	0.01103	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540
28	Emb._del_Porma-1	0.00812	0.01385	0.01103	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540
29	Emb._del_Porma-2	0.00812	0.01385	0.01103	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540
30	Lillo_Bierzo-1	0.00812	0.01385	0.01103	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540
31	Lillo_del_Bierzo	0.00812	0.01385	0.01103	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540
32	Montseny	0.01088	0.01667	0.01383	0.01364	0.01364	0.01088	0.01088	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814
33	Gresigne	0.01088	0.01667	0.01383	0.01364	0.01364	0.01088	0.01088	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814
34	Setcasses	0.01088	0.01667	0.01383	0.01364	0.01364	0.01088	0.01088	0.01088	0.01088	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814
35	Ucieda-1	0.00541	0.01112	0.00832	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00541	0.00541	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270
36	Ucieda-2	0.00541	0.01112	0.00832	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00541	0.00541	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270
37	Ucieda-3	0.00541	0.01112	0.00832	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00541	0.00541	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270
38	Ucieda-4	0.00541	0.01112	0.00832	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00541	0.00541	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270
39	Lillo_Bierzo-101	0.00541	0.01112	0.00832	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00541	0.00541	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270
40	Pto. Escudo	0.00541	0.01112	0.00832	0.00814	0.00814	0.00541	0.00541	0.00541	0.00541	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270
41	San Mamede	0.01360	0.01946	0.01662	0.01637	0.01637	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085
42	Sintra	0.01360	0.01946	0.01662	0.01637	0.01637	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085
43	Cabezuelas	0.01085	0.01662	0.01379	0.01360	0.01360	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812
44	Hervas	0.01085	0.01662	0.01379	0.01360	0.01360	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812
45	Pto. ElPalo1	0.02232	0.02787	0.02499	0.03096	0.03096	0.02808	0.02808	0.02808	0.02808	0.02521	0.02521	0.02521	0.02521	0.02521
46	Circo de Gredos	0.01360	0.01941	0.01656	0.02196	0.02196	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637
47	Cinco Lagunas	0.01360	0.01941	0.01656	0.02196	0.02196	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637
48	Pe?alara	0.01360	0.01941	0.01656	0.02196	0.02196	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637
49	Laguna Los Pajar	0.01360	0.01941	0.01656	0.02196	0.02196	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637
50	El Hornillo	0.01360	0.01941	0.01656	0.02196	0.02196	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637
51	El Fito	0.02238	0.02225	0.01941	0.02523	0.02523	0.02239	0.02239	0.02239	0.02239	0.01956	0.01956	0.02529	0.02529	0.02529
52	Luarca-1H	0.01634	0.02210	0.01924	0.02472	0.02472	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911
53	Luarca-75H	0.01637	0.02222	0.01935	0.02478	0.02478	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916
54	Oviedo-1	0.01911	0.03071	0.02780	0.03325	0.03325	0.03039	0.03039	0.03039	0.03039	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754
55	Oviedo-2	0.01911	0.03071	0.02780	0.03325	0.03325	0.03039	0.03039	0.03039	0.03039	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754
56	Oviedo-3	0.01911	0.03071	0.02780	0.03325	0.03325	0.03039	0.03039	0.03039	0.03039	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754
57	Oviedo-4	0.01911	0.03071	0.02780	0.03325	0.03325	0.03039	0.03039	0.03039	0.03039	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754
58	Cofi?al-69M	0.02472	0.02491	0.02774	0.03325	0.03325	0.03039	0.03039	0.03039	0.03039	0.02754	0.02754	0.02191	0.02191	0.02191
59	Trabada-17M	0.01916	0.02498	0.02209	0.02762	0.02762	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196
60	Amieva-27M	0.02191	0.02780	0.02491	0.03039	0.03039	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02471	0.02471	0.02471	0.02471	0.02471
61	Amieva-1	0.01634	0.02216	0.01930	0.02472	0.02472	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911
62	Amieva-2	0.01634	0.02216	0.01930	0.02472	0.02472	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911
63	R?o_Oza-1	0.01907	0.02483	0.02197	0.02744	0.02744	0.02463	0.02463	0.02463	0.02463	0.02184	0.02184	0.02184	0.02184	0.02184
64	R?o_Oza-64M	0.01634	0.02216	0.01930	0.02472	0.02472	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911
65	Monast._Hermo-1	0.02478	0.03068	0.02775	0.03335	0.03335	0.03047	0.03047	0.03047	0.03047	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762
66	Monast._Hermo-2	0.02478	0.03068	0.02775	0.03335	0.03335	0.03047	0.03047	0.03047	0.03047	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762
67	Monast._Hermo-3	0.02478	0.03068	0.02775	0.03335	0.03335	0.03047	0.03047	0.03047	0.03047	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762
68	Villablinos-1	0.02478	0.03068	0.02775	0.03335	0.03335	0.03047	0.03047	0.03047	0.03047	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762
69	Pto._Palo-48	0.02478	0.03068	0.02775	0.03335	0.03335	0.03047	0.03047	0.03047	0.03047	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762
70	Sierra_Monchique	0.02200	0.02807	0.02515	0.03053	0.03054	0.02766	0.02766	0.02766	0.02766	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481
71	Sierra_Monchique	0.02200	0.02807	0.02515	0.03053	0.03054	0.02766	0.02766	0.02766	0.02766	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481
72	Santiago do Cace	0.02200	0.02807	0.02515	0.03053	0.03054	0.02766	0.02766	0.02766	0.02766	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481
73	Sierra Morena	0.02196	0.02800	0.02509	0.03047	0.03047	0.02761	0.02761	0.02761	0.02761	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478
74	Sierra Aracena	0.01916	0.02510	0.02221	0.02762	0.02762	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196
75	Ri?par-1	0.01916	0.02510	0.02221	0.02762	0.02762	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196
76	Ri?par-2	0.01916	0.02510	0.02221	0.02762	0.02762	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196
77	Ba?os de la Enci	0.01916	0.02510	0.02221	0.02762	0.02762	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196
78	Sierra_Grazalema	0.04194	0.04828	0.04526	0.05080	0.05080	0.04782	0.04782	0.04782	0.04782	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487
79	Sierra_Grazalema	0.04194	0.04828	0.04526	0.05080	0.05080	0.04782	0.04782	0.04782	0.04782	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487
80	Ronda	0.04476	0.05112	0.04809	0.05364	0.05364	0.05066	0.05066	0.05066	0.05066	0.04769	0.04769	0.04769	0.04769	0.04769
81	S. atra	0.06830	0.07214	0.07214	0.07136	0.07137	0.06830	0.06830	0.06830	0.06830	0.06525	0.06525	0.06223	0.06223	0.06223
82	S. algira	0.10804	0.10782	0.10445	0.10464	0.10464	0.10131	0.10131	0.10131	0.10131	0.10468	0.10468	0.10468	0.10468	0.10468
83	S. lanzai	0.04465	0.05115	0.05412	0.05351	0.05351	0.05054	0.05054	0.05054	0.05054	0.04758	0.04758	0.04174	0.04174	0.04174
84	Ch. lusitanica	0.20464	0.20280	0.20275	0.20080	0.20082	0.19696	0.19696	0.19696	0.19696	0.19316	0.19316	0.19695	0.19695	0.19695
85	T. marmoratus	0.25801	0.25244	0.25662	0.24544	0.25381	0.24956	0.24956	0.24956	0.24956	0.24539	0.24539	0.24539	0.24539	0.24539
86	M. luschani	0.13542	0.13681	0.14029	0.13890	0.14596	0.14240	0.14240	0.14240	0.14240	0.13888	0.13888	0.13195	0.13195	0.13195
87	M. caucasica	0.24609	0.24878	0.24436	0.24184	0.23349	0.23759	0.23759	0.23759	0.23759	0.24176	0.24176	0.24176	0.24176	0.24176
88	Eu. asper	0.21219	0.21437	0.21049	0.20841	0.20842	0.20465	0.20465	0.20465	0.20465	0.20092	0.20092	0.20838	0.20838	0.20838
89	M._luschani-3	0.12647	0.12085	0.12425	0.12306	0.12305	0.11963	0.11963	0.11963	0.11963	0.11622	0.11622	0.11622	0.11622	0.11622
90	M._luschani-4	0.12994	0.12434	0.12777	0.12650	0.12649	0.12305	0.12305	0.12305	0.12305	0.11961	0.11961	0.11961	0.11961	0.11961
91	M._luschani-2	0.14205	0.14346	0.14698	0.14556	0.15270	0.14910	0.14910	0.14910	0.14910	0.14554	0.14554	0.13853	0.13853	0.13853

Matriz de distancia HKY

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
15 Benasque-1	-													
16 Benasque-2	0.00000	-												
17 Lanz-1	0.00000	0.00000	-											
18 Lanz-2	0.00000	0.00000	0.00000	-										
19 Lindux-1	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-									
20 Lindux-2	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-								
21 Mijares-10H	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	-							
22 San Pablo	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00269	-						
23 Mijares-2	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00269	0.00000	-					
24 Sierra Estrela	0.00543	0.00543	0.00543	0.00543	0.00543	0.00543	0.01090	0.00818	0.00818	-				
25 Isoba-1	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.01084	0.00812	0.00812	0.00542	-			
26 Isoba-2	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.01084	0.00812	0.00812	0.00542	0.00000	-		
27 Isoba-3	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.01084	0.00812	0.00812	0.00542	0.00000	0.00000	-	
28 Emb._del_Porma-1	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.01084	0.00812	0.00812	0.00542	0.00000	0.00000	0.00000	-
29 Emb._del_Porma-2	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.01084	0.00812	0.00812	0.00542	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
30 Lillo_Bierzo-1	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.01084	0.00812	0.00812	0.00542	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
31 Lillo_del_Bierzo	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.01084	0.00812	0.00812	0.00542	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
32 Montseny	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.01360	0.01088	0.01088	0.00818	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812
33 Gresigne	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.01360	0.01088	0.01088	0.00818	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812
34 Setcasses	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.00814	0.01360	0.01088	0.01088	0.00818	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812
35 Ucieda-1	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00812	0.00541	0.00541	0.00270	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
36 Ucieda-2	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00812	0.00541	0.00541	0.00270	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
37 Ucieda-3	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00812	0.00541	0.00541	0.00270	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
38 Ucieda-4	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00812	0.00541	0.00541	0.00270	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
39 Lillo_Bierzo-101	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00812	0.00541	0.00541	0.00270	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
40 Pto. Escudo	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00270	0.00812	0.00541	0.00541	0.00270	0.00269	0.00269	0.00269	0.00269
41 San Mamede	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.01634	0.01360	0.01360	0.01090	0.01084	0.01084	0.01084	0.01084
42 Sintra	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.01085	0.01634	0.01360	0.01360	0.01090	0.01084	0.01084	0.01084	0.01084
43 Cabezuelas	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.01358	0.01085	0.01085	0.00817	0.00811	0.00811	0.00811	0.00811
44 Hervas	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.01358	0.01085	0.01085	0.00817	0.00811	0.00811	0.00811	0.00811
45 Pto. ElPalo1	0.02521	0.02521	0.02521	0.02521	0.02521	0.02521	0.02514	0.02233	0.02233	0.02530	0.02514	0.02514	0.02514	0.02514
46 Circo de Gredos	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01634	0.01360	0.01360	0.01647	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634
47 Cinco Lagunas	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01634	0.01360	0.01360	0.01647	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634
48 Pe?alara	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01634	0.01360	0.01360	0.01647	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634
49 Laguna Los Pajar	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01634	0.01360	0.01360	0.01647	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634
50 El Hornillo	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01634	0.01360	0.01360	0.01647	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634
51 El Fito	0.02529	0.02529	0.02529	0.02529	0.02529	0.02529	0.02524	0.02239	0.02239	0.02533	0.02524	0.02524	0.02524	0.02524
52 Luarca-1H	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01908	0.01634	0.01634	0.01925	0.01908	0.01908	0.01908	0.01908
53 Luarca-75H	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01911	0.01637	0.01637	0.01927	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911
54 Oviedo-1	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02749	0.02472	0.02472	0.02771	0.02749	0.02749	0.02749	0.02749
55 Oviedo-2	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02749	0.02472	0.02472	0.02771	0.02749	0.02749	0.02749	0.02749
56 Oviedo-3	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02749	0.02472	0.02472	0.02771	0.02749	0.02749	0.02749	0.02749
57 Oviedo-4	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02754	0.02749	0.02472	0.02472	0.02771	0.02749	0.02749	0.02749	0.02749
58 Cofi?al-69M	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.02187	0.01911	0.01911	0.02770	0.02748	0.02748	0.02748	0.02748
59 Trabada-17M	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02191	0.01916	0.01916	0.02212	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191
60 Amieva-27M	0.02471	0.02471	0.02471	0.02471	0.02471	0.02471	0.02467	0.02191	0.02191	0.02485	0.02467	0.02467	0.02467	0.02467
61 Amieva-1	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01908	0.01634	0.01634	0.01923	0.01908	0.01908	0.01908	0.01908
62 Amieva-2	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01908	0.01634	0.01634	0.01923	0.01908	0.01908	0.01908	0.01908
63 R?o_Oza-1	0.02184	0.02184	0.02184	0.02184	0.02184	0.02184	0.02183	0.01907	0.01907	0.02200	0.02183	0.02183	0.02183	0.02183
64 R?o_Oza-64M	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01911	0.01908	0.01634	0.01634	0.01923	0.01908	0.01908	0.01908	0.01908
65 Monast._Hermo-1	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02755	0.02478	0.02478	0.02783	0.02755	0.02755	0.02755	0.02755
66 Monast._Hermo-2	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02755	0.02478	0.02478	0.02783	0.02755	0.02755	0.02755	0.02755
67 Monast._Hermo-3	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02755	0.02478	0.02478	0.02783	0.02755	0.02755	0.02755	0.02755
68 Villablinos-1	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02755	0.02478	0.02478	0.02783	0.02755	0.02755	0.02755	0.02755
69 Pto._Palo-48	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02755	0.02478	0.02478	0.02783	0.02755	0.02755	0.02755	0.02755
70 Sierra_Monchique	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02476	0.02200	0.02200	0.02485	0.02477	0.02477	0.02477	0.02477
71 Sierra_Monchique	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02476	0.02200	0.02200	0.02485	0.02477	0.02477	0.02477	0.02477
72 Santiago do Cace	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02481	0.02476	0.02200	0.02200	0.02485	0.02477	0.02477	0.02477	0.02477
73 Sierra Morena	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02472	0.02196	0.02196	0.02489	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472
74 Sierra Aracena	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02191	0.01916	0.01916	0.02207	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191
75 Ri?par-1	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02191	0.01916	0.01916	0.02207	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191
76 Ri?par-2	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02191	0.01916	0.01916	0.02207	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191
77 Ba?os de la Enci	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02191	0.01916	0.01916	0.02207	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191
78 Sierra_Grazalema	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487	0.04475	0.04194	0.04194	0.04505	0.04475	0.04475	0.04475	0.04475
79 Sierra_Grazalema	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487	0.04487	0.04475	0.04194	0.04194	0.04505	0.04475	0.04475	0.04475	0.04475
80 Ronda	0.04769	0.04769	0.04769	0.04769	0.04769	0.04769	0.04758	0.04475	0.04475	0.04790	0.04758	0.04758	0.04758	0.04758
81 S. atra	0.06223	0.06223	0.06223	0.06223	0.06223	0.06223	0.06815	0.06525	0.06525	0.06282	0.06512	0.06512	0.06512	0.06512
82 S. algira	0.10468	0.10468	0.10468	0.10468	0.10468	0.10468	0.11112	0.10804	0.10804	0.10517	0.10437	0.10437	0.10437	0.10437
83 S. lanzai	0.04174	0.04174	0.04174	0.04174	0.04174	0.04174	0.04748	0.04465	0.04465	0.04777	0.04748	0.04748	0.04748	0.04748
84 Ch. lusitanica	0.19695	0.19695	0.19695	0.19695	0.19695	0.19695	0.20421	0.20079	0.20079	0.19322	0.20037	0.20037	0.20037	0.20037
85 T. marmoratus	0.24539	0.24539	0.24539	0.24539	0.24539	0.24539	0.25318	0.24956	0.24956	0.25225	0.25318	0.25318	0.25318	0.25318
86 M. luschani	0.13195	0.13195	0.13195	0.13195	0.13195	0.13195	0.13164	0.12852	0.12852	0.12972	0.13227	0.13227	0.13227	0.13227
87 M. caucasica	0.24176	0.24176	0.24176	0.24176	0.24176	0.24176	0.24961	0.24605	0.24605	0.24319	0.23400	0.23400	0.23400	0.23400
88 Eu. asper	0.20838	0.20838	0.20838	0.20838	0.20838	0.20838	0.21567	0.21217	0.21217	0.20632	0.20118	0.20118	0.20118	0.20118
89 M._luschani-3	0.11622	0.11622	0.11622	0.11622	0.11622	0.11622	0.12270	0.11963	0.11963	0.11397	0.12268	0.12268	0.12268	0.12268
90 M._luschani-4	0.11961	0.11961	0.11961	0.11961	0.11961	0.11961	0.12613	0.12305	0.12305	0.11740	0.12611	0.12611	0.12611	0.12611
91 M._luschani-2	0.13853	0.13853	0.13853	0.13853	0.13853	0.13853	0.13821	0.13507	0.13507	0.13629	0.13887	0.13887	0.13887	0.13887

Matriz de distancia HKY

	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
29 Emb._del_Porma-2	-													
30 Lillo_Bierzo-1	0.00000	-												
31 Lillo_del_Bierzo	0.00000	0.00000	-											
32 Montseny	0.00812	0.00812	0.00812	-										
33 Gresigne	0.00812	0.00812	0.00812	0.00000	-									
34 Setcasses	0.00812	0.00812	0.00812	0.00000	0.00000	-								
35 Ucieda-1	0.00269	0.00269	0.00269	0.00541	0.00541	0.00541	-							
36 Ucieda-2	0.00269	0.00269	0.00269	0.00541	0.00541	0.00541	0.00000	-						
37 Ucieda-3	0.00269	0.00269	0.00269	0.00541	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	-					
38 Ucieda-4	0.00269	0.00269	0.00269	0.00541	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000	-				
39 Lillo_Bierzo-101	0.00269	0.00269	0.00269	0.00541	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-			
40 Pto. Escudo	0.00269	0.00269	0.00269	0.00541	0.00541	0.00541	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-		
41 San Mamede	0.01084	0.01084	0.01084	0.01360	0.01360	0.01360	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	-	
42 Sintra	0.01084	0.01084	0.01084	0.01360	0.01360	0.01360	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00812	0.00000	-
43 Cabezuelas	0.00811	0.00811	0.00811	0.01085	0.01085	0.01085	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00270	0.00270
44 Hervas	0.00811	0.00811	0.00811	0.01085	0.01085	0.01085	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00540	0.00270	0.00270
45 Pto. ElPalo1	0.02514	0.02514	0.02514	0.02808	0.02808	0.02808	0.02236	0.02236	0.02236	0.02236	0.02236	0.02236	0.03091	0.03091
46 Circo de Gredos	0.01634	0.01634	0.01634	0.01916	0.01916	0.01916	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01634	0.01634
47 Cinco Lagunas	0.01634	0.01634	0.01634	0.01916	0.01916	0.01916	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01634	0.01634
48 Pe?alara	0.01634	0.01634	0.01634	0.01916	0.01916	0.01916	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01634	0.01634
49 Laguna Los Pajar	0.01634	0.01634	0.01634	0.01916	0.01916	0.01916	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01634	0.01634
50 El Hornillo	0.01634	0.01634	0.01634	0.01916	0.01916	0.01916	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01360	0.01634	0.01634
51 El Fito	0.02524	0.02524	0.02524	0.02815	0.02815	0.02815	0.02245	0.02245	0.02245	0.02245	0.02245	0.02245	0.03102	0.03102
52 Luarca-1H	0.01908	0.01908	0.01908	0.02191	0.02191	0.02191	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.02467	0.02467
53 Luarca-75H	0.01911	0.01911	0.01911	0.02196	0.02196	0.02196	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.01637	0.02472	0.02472
54 Oviedo-1	0.02749	0.02749	0.02749	0.03039	0.03039	0.03039	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.03317	0.03317
55 Oviedo-2	0.02749	0.02749	0.02749	0.03039	0.03039	0.03039	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.03317	0.03317
56 Oviedo-3	0.02749	0.02749	0.02749	0.03039	0.03039	0.03039	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.03317	0.03317
57 Oviedo-4	0.02749	0.02749	0.02749	0.03039	0.03039	0.03039	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.02472	0.03317	0.03317
58 Cofi?al-69M	0.02748	0.02748	0.02748	0.03039	0.03039	0.03039	0.02471	0.02471	0.02471	0.02471	0.02471	0.02471	0.03317	0.03317
59 Trabada-17M	0.02191	0.02191	0.02191	0.02478	0.02478	0.02478	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.02754	0.02754
60 Amieva-27M	0.02467	0.02467	0.02467	0.02754	0.02754	0.02754	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.02191	0.03032	0.03032
61 Amieva-1	0.01908	0.01908	0.01908	0.02191	0.02191	0.02191	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.02467	0.02467
62 Amieva-2	0.01908	0.01908	0.01908	0.02191	0.02191	0.02191	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.02467	0.02467
63 R?o_Oza-1	0.02183	0.02183	0.02183	0.02463	0.02463	0.02463	0.01907	0.01907	0.01907	0.01907	0.01907	0.01907	0.02741	0.02741
64 R?o_Oza-64M	0.01908	0.01908	0.01908	0.02191	0.02191	0.02191	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.01634	0.02467	0.02467
65 Monast._Hermo-1	0.02755	0.02755	0.02755	0.03047	0.03047	0.03047	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.03325	0.03325
66 Monast._Hermo-2	0.02755	0.02755	0.02755	0.03047	0.03047	0.03047	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.03325	0.03325
67 Monast._Hermo-3	0.02755	0.02755	0.02755	0.03047	0.03047	0.03047	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.03325	0.03325
68 Villablinos-1	0.02755	0.02755	0.02755	0.03047	0.03047	0.03047	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.03325	0.03325
69 Pto._Palo-48	0.02755	0.02755	0.02755	0.03047	0.03047	0.03047	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.03325	0.03325
70 Sierra_Monchique	0.02477	0.02477	0.02477	0.02766	0.02766	0.02766	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.03044	0.03044
71 Sierra_Monchique	0.02477	0.02477	0.02477	0.02766	0.02766	0.02766	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.03044	0.03044
72 Santiago do Cace	0.02477	0.02477	0.02477	0.02766	0.02766	0.02766	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.02198	0.03044	0.03044
73 Sierra Morena	0.02472	0.02472	0.02472	0.02761	0.02761	0.02761	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.03039	0.03039
74 Sierra Aracena	0.02191	0.02191	0.02191	0.02478	0.02478	0.02478	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.02754	0.02754
75 Ri?par-1	0.02191	0.02191	0.02191	0.02478	0.02478	0.02478	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.02754	0.02754
76 Ri?par-2	0.02191	0.02191	0.02191	0.02478	0.02478	0.02478	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.02754	0.02754
77 Ba?os de la Enci	0.02191	0.02191	0.02191	0.02478	0.02478	0.02478	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.01916	0.02754	0.02754
78 Sierra_Grazalema	0.04475	0.04475	0.04475	0.04782	0.04782	0.04782	0.04193	0.04193	0.04193	0.04193	0.04193	0.04193	0.05066	0.05066
79 Sierra_Grazalema	0.04475	0.04475	0.04475	0.04782	0.04782	0.04782	0.04193	0.04193	0.04193	0.04193	0.04193	0.04193	0.05066	0.05066
80 Ronda	0.04758	0.04758	0.04758	0.05066	0.05066	0.05066	0.04475	0.04475	0.04475	0.04475	0.04475	0.04475	0.05350	0.05350
81 S. atra	0.06512	0.06512	0.06512	0.06830	0.06830	0.06830	0.06222	0.06222	0.06222	0.06222	0.06222	0.06222	0.07121	0.07121
82 S. algira	0.10437	0.10437	0.10437	0.10804	0.10804	0.10804	0.10135	0.10135	0.10135	0.10135	0.10135	0.10135	0.10438	0.10438
83 S. lanzai	0.04748	0.04748	0.04748	0.05054	0.05054	0.05054	0.04465	0.04465	0.04465	0.04465	0.04465	0.04465	0.05339	0.05339
84 Ch. lusitanica	0.20037	0.20037	0.20037	0.19696	0.19696	0.19696	0.19691	0.19691	0.19691	0.19691	0.19691	0.19691	0.20039	0.20039
85 T. marmoratus	0.25318	0.25318	0.25318	0.24956	0.24956	0.24956	0.24952	0.24952	0.24952	0.24952	0.24952	0.24952	0.26167	0.26167
86 M. luschani	0.13227	0.13227	0.13227	0.13541	0.13541	0.13541	0.13539	0.13539	0.13539	0.13539	0.13539	0.13539	0.14558	0.14558
87 M. caucasica	0.23400	0.23400	0.23400	0.23759	0.23759	0.23759	0.23752	0.23752	0.23752	0.23752	0.23752	0.23752	0.23281	0.23281
88 Eu. asper	0.20118	0.20118	0.20118	0.21217	0.21217	0.21217	0.20463	0.20463	0.20463	0.20463	0.20463	0.20463	0.21569	0.21569
89 M._luschani-3	0.12268	0.12268	0.12268	0.11963	0.11963	0.11963	0.11959	0.11959	0.11959	0.11959	0.11959	0.11959	0.12954	0.12954
90 M._luschani-4	0.12611	0.12611	0.12611	0.12305	0.12305	0.12305	0.12301	0.12301	0.12301	0.12301	0.12301	0.12301	0.13302	0.13302
91 M._luschani-2	0.13887	0.13887	0.13887	0.14203	0.14203	0.14203	0.14202	0.14202	0.14202	0.14202	0.14202	0.14202	0.15230	0.15230

Matriz de distancia HKY

	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
43 Cabezuelas	-													
44 Hervas	0.00000	-												
45 Pto. ElPalo1	0.02800	0.02800	-											
46 Circo de Gredos	0.01358	0.01358	0.02817	-										
47 Cinco Lagunas	0.01358	0.01358	0.02817	0.00000	-									
48 Pe?alara	0.01358	0.01358	0.02817	0.00000	0.00000	-								
49 Laguna Los Pajar	0.01358	0.01358	0.02817	0.00000	0.00000	0.00000	-							
50 El Hornillo	0.01358	0.01358	0.02817	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-						
51 El Fito	0.02809	0.02809	0.02803	0.02244	0.02244	0.02244	0.02244	0.02244	-					
52 Luarca-1H	0.02187	0.02187	0.01661	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02232	-				
53 Luarca-75H	0.02191	0.02191	0.02240	0.02203	0.02203	0.02203	0.02203	0.02203	0.00827	0.01637	-			
54 Oviedo-1	0.03032	0.03032	0.03096	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.00550	0.02472	0.00812	-		
55 Oviedo-2	0.03032	0.03032	0.03096	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.00550	0.02472	0.00812	0.00000	-	
56 Oviedo-3	0.03032	0.03032	0.03096	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.00550	0.02472	0.00812	0.00000	0.00000	-
57 Oviedo-4	0.03032	0.03032	0.03096	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.02478	0.00550	0.02472	0.00812	0.00000	0.00000	0.00000
58 Cofi?al-69M	0.03032	0.03032	0.03090	0.03047	0.03047	0.03047	0.03047	0.03047	0.02232	0.02472	0.01360	0.02191	0.02191	0.02191
59 Trabada-17M	0.02472	0.02472	0.00822	0.02486	0.02486	0.02486	0.02486	0.02486	0.02522	0.01360	0.01921	0.02762	0.02762	0.02762
60 Amieva-27M	0.02748	0.02748	0.02801	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.02762	0.01948	0.02191	0.01085	0.01911	0.01911	0.01911
61 Amieva-1	0.02187	0.02187	0.02233	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.01384	0.01634	0.00540	0.01358	0.01358	0.01358
62 Amieva-2	0.02187	0.02187	0.02233	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.01384	0.01634	0.00540	0.01358	0.01358	0.01358
63 R?o_Oza-1	0.02461	0.02461	0.02502	0.02187	0.02187	0.02187	0.02187	0.02187	0.02218	0.00811	0.01908	0.02463	0.02463	0.02463
64 R?o_Oza-64M	0.02187	0.02187	0.02232	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02196	0.02238	0.00541	0.01637	0.02472	0.02472	0.02472
65 Monast._Hermo-1	0.03039	0.03039	0.00272	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03098	0.01916	0.02486	0.03335	0.03335	0.03335
66 Monast._Hermo-2	0.03039	0.03039	0.00272	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03098	0.01916	0.02486	0.03335	0.03335	0.03335
67 Monast._Hermo-3	0.03039	0.03039	0.00272	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03098	0.01916	0.02486	0.03335	0.03335	0.03335
68 Villablinos-1	0.03039	0.03039	0.00272	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03098	0.01916	0.02486	0.03335	0.03335	0.03335
69 Pto._Palo-48	0.03039	0.03039	0.00272	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03057	0.03098	0.01916	0.02486	0.03335	0.03335	0.03335
70 Sierra_Monchique	0.02761	0.02761	0.03399	0.01925	0.01925	0.01925	0.01925	0.01925	0.02541	0.03055	0.02489	0.02769	0.02769	0.02769
71 Sierra_Monchique	0.02761	0.02761	0.03399	0.01925	0.01925	0.01925	0.01925	0.01925	0.02541	0.03055	0.02489	0.02769	0.02769	0.02769
72 Santiago do Cace	0.02761	0.02761	0.03399	0.01925	0.01925	0.01925	0.01925	0.01925	0.02541	0.03055	0.02489	0.02769	0.02769	0.02769
73 Sierra Morena	0.02754	0.02754	0.03697	0.01921	0.01921	0.01921	0.01921	0.01921	0.02536	0.03047	0.02485	0.02762	0.02762	0.02762
74 Sierra Aracena	0.02472	0.02472	0.03401	0.01642	0.01642	0.01642	0.01642	0.01642	0.02244	0.02762	0.02203	0.02478	0.02478	0.02478
75 Ri?par-1	0.02472	0.02472	0.03401	0.01642	0.01642	0.01642	0.01642	0.01642	0.02244	0.02762	0.02203	0.02478	0.02478	0.02478
76 Ri?par-2	0.02472	0.02472	0.03401	0.01642	0.01642	0.01642	0.01642	0.01642	0.02244	0.02762	0.02203	0.02478	0.02478	0.02478
77 Ba?os de la Enci	0.02472	0.02472	0.03401	0.01642	0.01642	0.01642	0.01642	0.01642	0.02244	0.02762	0.02203	0.02478	0.02478	0.02478
78 Sierra_Grazalema	0.04770	0.04770	0.05169	0.04500	0.04500	0.04500	0.04500	0.04500	0.05806	0.05080	0.05095	0.05983	0.05983	0.05983
79 Sierra_Grazalema	0.04770	0.04770	0.05169	0.04500	0.04500	0.04500	0.04500	0.04500	0.05806	0.05080	0.05095	0.05983	0.05983	0.05983
80 Ronda	0.05054	0.05054	0.05456	0.04783	0.04783	0.04783	0.04783	0.04783	0.06095	0.05364	0.05379	0.06270	0.06270	0.06270
81 S. atra	0.06816	0.06816	0.07328	0.06237	0.06237	0.06237	0.06237	0.06237	0.07352	0.07445	0.07463	0.07756	0.07756	0.07756
82 S. algira	0.10772	0.10772	0.11205	0.11178	0.11178	0.11178	0.11178	0.11178	0.11954	0.11136	0.11177	0.12176	0.12176	0.12176
83 S. lanzai	0.05043	0.05043	0.06065	0.04770	0.04770	0.04770	0.04770	0.04770	0.06089	0.05951	0.05966	0.05650	0.05650	0.05650
84 Ch. lusitanica	0.19662	0.19662	0.20738	0.19359	0.19359	0.19359	0.19359	0.19359	0.18947	0.19702	0.19735	0.19782	0.19782	0.19782
85 T. marmoratus	0.25745	0.25745	0.27670	0.26599	0.26599	0.26599	0.26599	0.26599	0.25583	0.26539	0.25743	0.26543	0.26543	0.26543
86 M. luschani	0.14207	0.14207	0.14595	0.12886	0.12886	0.12886	0.12886	0.12886	0.14276	0.13891	0.13925	0.14597	0.14597	0.14597
87 M. caucasica	0.23700	0.23700	0.24243	0.23831	0.23831	0.23831	0.23831	0.23831	0.25194	0.24189	0.24251	0.25047	0.25047	0.25047
88 Eu. asper	0.21191	0.21191	0.22387	0.21953	0.21953	0.21953	0.21953	0.21953	0.21310	0.22694	0.21569	0.22309	0.22309	0.22309
89 M._luschani-3	0.12611	0.12611	0.14050	0.12338	0.12338	0.12338	0.12338	0.12338	0.12302	0.12652	0.12686	0.13347	0.13347	0.13347
90 M._luschani-4	0.12956	0.12956	0.14419	0.12684	0.12684	0.12684	0.12684	0.12684	0.12660	0.12999	0.13034	0.13699	0.13699	0.13699
91 M._luschani-2	0.14875	0.14875	0.15273	0.13542	0.13542	0.13542	0.13542	0.13542	0.14956	0.14557	0.14593	0.15271	0.15271	0.15271

Matriz de distancia HKY

	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
57 Oviedo-4	-													
58 Cofi?al-69M	0.02191	-												
59 Trabada-17M	0.02762	0.02762	-											
60 Amieva-27M	0.01911	0.00270	0.02478	-										
61 Amieva-1	0.01358	0.00814	0.01916	0.00541	-									
62 Amieva-2	0.01358	0.00814	0.01916	0.00541	0.00000	-								
63 R?o_Oza-1	0.02463	0.02744	0.02187	0.02463	0.01907	0.01907	-							
64 R?o_Oza-64M	0.02472	0.02472	0.01916	0.02191	0.01634	0.01634	0.00811	-						
65 Monast._Hermo-1	0.03335	0.03335	0.00541	0.03047	0.02478	0.02478	0.02749	0.02478	-					
66 Monast._Hermo-2	0.03335	0.03335	0.00541	0.03047	0.02478	0.02478	0.02749	0.02478	0.00000	-				
67 Monast._Hermo-3	0.03335	0.03335	0.00541	0.03047	0.02478	0.02478	0.02749	0.02478	0.00000	0.00000	-			
68 Villablinos-1	0.03335	0.03335	0.00541	0.03047	0.02478	0.02478	0.02749	0.02478	0.00000	0.00000	0.00000	-		
69 Pto._Palo-48	0.03335	0.03335	0.00541	0.03047	0.02478	0.02478	0.02749	0.02478	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
70 Sierra_Monchique	0.02769	0.03347	0.03066	0.03058	0.02483	0.02483	0.03045	0.03053	0.03647	0.03647	0.03647	0.03647	0.03647	-
71 Sierra_Monchique	0.02769	0.03347	0.03066	0.03058	0.02483	0.02483	0.03045	0.03053	0.03647	0.03647	0.03647	0.03647	0.03647	0.00000
72 Santiago do Cace	0.02769	0.03347	0.03066	0.03058	0.02483	0.02483	0.03045	0.03053	0.03647	0.03647	0.03647	0.03647	0.03647	0.00000
73 Sierra Morena	0.02762	0.03334	0.03345	0.03047	0.02478	0.02478	0.03032	0.03047	0.03927	0.03927	0.03927	0.03927	0.03927	0.02205
74 Sierra Aracena	0.02478	0.03047	0.03057	0.02761	0.02196	0.02196	0.02749	0.02761	0.03636	0.03636	0.03636	0.03636	0.03636	0.01925
75 Ri?par-1	0.02478	0.03047	0.03057	0.02761	0.02196	0.02196	0.02749	0.02761	0.03636	0.03636	0.03636	0.03636	0.03636	0.01925
76 Ri?par-2	0.02478	0.03047	0.03057	0.02761	0.02196	0.02196	0.02749	0.02761	0.03636	0.03636	0.03636	0.03636	0.03636	0.01925
77 Ba?os de la Enci	0.02478	0.03047	0.03057	0.02761	0.02196	0.02196	0.02749	0.02761	0.03636	0.03636	0.03636	0.03636	0.03636	0.01925
78 Sierra_Grazalema	0.05983	0.05983	0.05396	0.05680	0.05080	0.05080	0.05351	0.05079	0.05397	0.05397	0.05397	0.05397	0.05397	0.05422
79 Sierra_Grazalema	0.05983	0.05983	0.05396	0.05680	0.05080	0.05080	0.05351	0.05079	0.05397	0.05397	0.05397	0.05397	0.05397	0.05422
80 Ronda	0.06270	0.06270	0.05681	0.05966	0.05364	0.05364	0.05637	0.05364	0.05681	0.05681	0.05681	0.05681	0.05681	0.05710
81 S. atra	0.07756	0.08068	0.07776	0.08068	0.07445	0.07445	0.07414	0.06830	0.07777	0.07777	0.07777	0.07777	0.07777	0.07545
82 S. algira	0.12176	0.12167	0.11516	0.11821	0.11141	0.11141	0.11407	0.11140	0.11521	0.11521	0.11521	0.11521	0.11521	0.12275
83 S. lanzai	0.05650	0.06253	0.06271	0.06558	0.05951	0.05951	0.05924	0.05950	0.06272	0.06272	0.06272	0.06272	0.06272	0.05683
84 Ch. lusitanica	0.19782	0.19398	0.19746	0.19393	0.19015	0.19015	0.19326	0.19696	0.20139	0.20139	0.20139	0.20139	0.20139	0.20589
85 T. marmoratus	0.26543	0.26536	0.26176	0.26962	0.26536	0.26536	0.25691	0.25686	0.27048	0.27048	0.27048	0.27048	0.27048	0.26021
86 M. luschani	0.14597	0.14240	0.14994	0.14593	0.13890	0.13890	0.13197	0.13889	0.14999	0.14999	0.14999	0.14999	0.14999	0.13717
87 M. caucasica	0.25047	0.26064	0.23420	0.25617	0.24750	0.24750	0.23477	0.24180	0.23432	0.23432	0.23432	0.23432	0.23432	0.22818
88 Eu. asper	0.22309	0.22692	0.22730	0.22304	0.21922	0.21922	0.21984	0.21921	0.22736	0.22736	0.22736	0.22736	0.22736	0.21452
89 M._luschani-3	0.13347	0.11693	0.13745	0.12033	0.12034	0.12034	0.12307	0.12648	0.14465	0.14465	0.14465	0.14465	0.14465	0.13174
90 M._luschani-4	0.13699	0.12035	0.14101	0.12377	0.12379	0.12379	0.12651	0.12995	0.14826	0.14826	0.14826	0.14826	0.14826	0.13530
91 M._luschani-2	0.15271	0.14556	0.15673	0.14909	0.14556	0.14556	0.13856	0.14555	0.15678	0.15678	0.15678	0.15678	0.15678	0.14388

Matriz de distancia HKY

	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
71 Sierra_Monchique	-													
72 Santiago do Cace	0.00000	-												
73 Sierra Morena	0.02205	0.02205	-											
74 Sierra Aracena	0.01925	0.01925	0.00270	-										
75 Ri?par-1	0.01925	0.01925	0.00270	0.00000	-									
76 Ri?par-2	0.01925	0.01925	0.00270	0.00000	0.00000	-								
77 Ba?os de la Enci	0.01925	0.01925	0.00270	0.00000	0.00000	0.00000	-							
78 Sierra_Grazalema	0.05422	0.05422	0.05395	0.05095	0.05095	0.05095	0.05095	-						
79 Sierra_Grazalema	0.05422	0.05422	0.05395	0.05095	0.05095	0.05095	0.05095	0.00000	-					
80 Ronda	0.05710	0.05710	0.05680	0.05379	0.05379	0.05379	0.05379	0.00269	0.00269	-				
81 S. atra	0.07545	0.07545	0.07774	0.07463	0.07463	0.07463	0.07463	0.06828	0.06828	0.07119	-			
82 S. algira	0.12275	0.12275	0.11523	0.11868	0.11868	0.11868	0.11868	0.11141	0.11141	0.11445	0.11362	-		
83 S. lanzai	0.05683	0.05683	0.05664	0.05364	0.05364	0.05364	0.05364	0.06252	0.06252	0.06540	0.05623	0.09427	-	
84 Ch. lusitanica	0.20589	0.20589	0.19355	0.19738	0.19738	0.19738	0.19738	0.22014	0.22014	0.22368	0.20505	0.21736	0.19378	-
85 T. marmoratus	0.26021	0.26021	0.26592	0.27027	0.27027	0.27027	0.27027	0.27380	0.27380	0.27007	0.26619	0.26253	0.26413	0.23902
86 M. luschani	0.13717	0.13717	0.12883	0.13229	0.13229	0.13229	0.13229	0.16026	0.16026	0.16349	0.15936	0.17965	0.12509	0.17894
87 M. caucasica	0.22818	0.22818	0.23824	0.23828	0.23828	0.23828	0.23828	0.23741	0.23741	0.24097	0.24316	0.23011	0.22913	0.24557
88 Eu. asper	0.21452	0.21452	0.21189	0.21569	0.21569	0.21569	0.21569	0.22683	0.22683	0.23041	0.22289	0.26488	0.22299	0.25025
89 M._luschani-3	0.13174	0.13174	0.12337	0.11996	0.11996	0.11996	0.11996	0.14750	0.14750	0.15068	0.11553	0.16644	0.11884	0.16583
90 M._luschani-4	0.13530	0.13530	0.12682	0.12339	0.12339	0.12339	0.12339	0.15112	0.15112	0.15431	0.11890	0.17025	0.12224	0.16220
91 M._luschani-2	0.14388	0.14388	0.13539	0.13888	0.13888	0.13888	0.13888	0.16715	0.16715	0.17041	0.16622	0.18676	0.13160	0.17922

Matriz de distancia HKY

	85	86	87	88	89	90	91
85 T. marmoratus	-						
86 M. luschani	0.23648	-					
87 M. caucasica	0.26374	0.25047	-				
88 Eu. asper	0.20801	0.24461	0.27775	-			
89 M._luschani-3	0.24726	0.10375	0.24925	0.24507	-		
90 M._luschani-4	0.24306	0.10043	0.24489	0.24506	0.00271	-	
91 M._luschani-2	0.23288	0.00540	0.25404	0.24097	0.10673	0.10339	-

Matriz de distancia HKY+I+G

	1	2	3	4	5	6	7
1 Guadalupe	-						
2 Fonsagrada	0.01158	-					
3 Castromar?n	0.00854	0.00274	-				
4 Pto. Padornelo	0.01443	0.00854	0.00559	-			
5 Pto._Palo-2	0.01443	0.00854	0.00559	0.00553	-		
6 Lugo-1	0.01138	0.00566	0.00279	0.00273	0.00273	-	
7 Lugo-2	0.01138	0.00566	0.00279	0.00273	0.00273	0.00000	-
8 Trabada-1	0.01138	0.00566	0.00279	0.00273	0.00273	0.00000	0.00000
9 Trabada-2	0.01138	0.00566	0.00279	0.00273	0.00273	0.00000	0.00000
10 Palacios_del_Sil	0.00841	0.00861	0.00565	0.00553	0.00553	0.00273	0.00273
11 Palacios_del_Sil	0.00841	0.00861	0.00565	0.00553	0.00553	0.00273	0.00273
12 Arguenos-1	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
13 Arguenos-2	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
14 Arguenos-3	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
15 Benasque-1	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
16 Benasque-2	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
17 Lanz-1	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
18 Lanz-2	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
19 Lindux-1	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
20 Lindux-2	0.00841	0.00861	0.01158	0.01137	0.01138	0.00841	0.00841
21 Mijares-10H	0.00831	0.00850	0.01143	0.01732	0.01732	0.01423	0.01423
22 San Pablo	0.00553	0.00566	0.00854	0.01442	0.01443	0.01137	0.01137
23 Mijares-2	0.00553	0.00566	0.00854	0.01442	0.01443	0.01137	0.01137
24 Sierra Estrela	0.00846	0.01480	0.01165	0.01145	0.01145	0.00846	0.00846
25 Isoba-1	0.00831	0.01451	0.01143	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831
26 Isoba-2	0.00831	0.01451	0.01143	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831
27 Isoba-3	0.00831	0.01451	0.01143	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831
28 Emb._del_Porma-1	0.00831	0.01451	0.01143	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831
29 Emb._del_Porma-2	0.00831	0.01451	0.01143	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831
30 Lillo_Bierzo-1	0.00831	0.01451	0.01143	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831
31 Lillo_del_Bierzo	0.00831	0.01451	0.01143	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831
32 Montseny	0.01138	0.01785	0.01463	0.01442	0.01443	0.01137	0.01137
33 Gresigne	0.01138	0.01785	0.01463	0.01442	0.01443	0.01137	0.01137
34 Setcasses	0.01138	0.01785	0.01463	0.01442	0.01443	0.01137	0.01137
35 Ucieda-1	0.00553	0.01164	0.00860	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553
36 Ucieda-2	0.00553	0.01164	0.00860	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553
37 Ucieda-3	0.00553	0.01164	0.00860	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553
38 Ucieda-4	0.00553	0.01164	0.00860	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553
39 Lillo_Bierzo-101	0.00553	0.01164	0.00860	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553
40 Pto. Escudo	0.00553	0.01164	0.00860	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553
41 San Mamede	0.01423	0.02086	0.01760	0.01732	0.01732	0.01423	0.01423
42 Sintra	0.01423	0.02086	0.01760	0.01732	0.01732	0.01423	0.01423
43 Cabezuelas	0.01123	0.01760	0.01444	0.01423	0.01424	0.01123	0.01123

44 Hervas	0.01123	0.01760	0.01444	0.01423	0.01424	0.01123	0.01123
45 Pto. ElPalo1	0.02421	0.03094	0.02741	0.03481	0.03481	0.03118	0.03118
46 Circo de Gredos	0.01424	0.02079	0.01753	0.02378	0.02378	0.02050	0.02050
47 Cinco Lagunas	0.01424	0.02079	0.01753	0.02378	0.02378	0.02050	0.02050
48 Pe?alara	0.01424	0.02079	0.01753	0.02378	0.02378	0.02050	0.02050
49 Laguna Los Pajar	0.01424	0.02079	0.01753	0.02378	0.02378	0.02050	0.02050
50 El Hornillo	0.01424	0.02079	0.01753	0.02378	0.02378	0.02050	0.02050
51 El Fito	0.02405	0.02390	0.02062	0.02742	0.02742	0.02406	0.02406
52 Luarca-1H	0.01715	0.02373	0.02043	0.02681	0.02682	0.02350	0.02350
53 Luarca-75H	0.01732	0.02408	0.02072	0.02714	0.02714	0.02377	0.02377
54 Oviedo-1	0.02028	0.03414	0.03054	0.03736	0.03737	0.03374	0.03374
55 Oviedo-2	0.02028	0.03414	0.03054	0.03736	0.03737	0.03374	0.03374
56 Oviedo-3	0.02028	0.03414	0.03054	0.03736	0.03737	0.03374	0.03374
57 Oviedo-4	0.02028	0.03414	0.03054	0.03736	0.03737	0.03374	0.03374
58 Cofi?al-69M	0.02681	0.02704	0.03046	0.03735	0.03736	0.03373	0.03373
59 Trabada-17M	0.02051	0.02739	0.02394	0.03062	0.03062	0.02714	0.02714
60 Amieva-27M	0.02350	0.03053	0.02704	0.03373	0.03374	0.03022	0.03022
61 Amieva-1	0.01715	0.02379	0.02049	0.02681	0.02682	0.02350	0.02350
62 Amieva-2	0.01715	0.02379	0.02049	0.02681	0.02682	0.02350	0.02350
63 R?o_Oza-1	0.02004	0.02660	0.02331	0.02968	0.02968	0.02637	0.02637
64 R?o_Oza-64M	0.01715	0.02379	0.02049	0.02681	0.02681	0.02350	0.02350
65 Monast._Hermo-1	0.02716	0.03446	0.03079	0.03788	0.03789	0.03420	0.03420
66 Monast._Hermo-2	0.02716	0.03446	0.03079	0.03788	0.03789	0.03420	0.03420
67 Monast._Hermo-3	0.02716	0.03446	0.03079	0.03788	0.03789	0.03420	0.03420
68 Villablinos-1	0.02716	0.03446	0.03079	0.03788	0.03789	0.03420	0.03420
69 Pto._Palo-48	0.02716	0.03446	0.03079	0.03788	0.03789	0.03420	0.03420
70 Sierra_Monchique	0.02361	0.03086	0.02732	0.03391	0.03392	0.03036	0.03036
71 Sierra_Monchique	0.02361	0.03086	0.02732	0.03391	0.03392	0.03036	0.03036
72 Santiago do Cace	0.02361	0.03086	0.02732	0.03391	0.03392	0.03036	0.03036
73 Sierra Morena	0.02377	0.03107	0.02751	0.03417	0.03417	0.03060	0.03060
74 Sierra Aracena	0.02050	0.02752	0.02407	0.03060	0.03061	0.02714	0.02714
75 Ri?par-1	0.02050	0.02752	0.02407	0.03060	0.03061	0.02714	0.02714
76 Ri?par-2	0.02050	0.02752	0.02407	0.03060	0.03061	0.02714	0.02714
77 Ba?os de la Enci	0.02050	0.02752	0.02407	0.03060	0.03061	0.02714	0.02714
78 Sierra_Grazalema	0.04882	0.05772	0.05341	0.06137	0.06139	0.05705	0.05705
79 Sierra_Grazalema	0.04882	0.05772	0.05341	0.06137	0.06139	0.05705	0.05705
80 Ronda	0.05221	0.06124	0.05687	0.06494	0.06496	0.06056	0.06056
81 S. atra	0.08553	0.09177	0.09175	0.09051	0.09054	0.08551	0.08551
82 S. algira	0.16431	0.16393	0.15636	0.15669	0.15677	0.14940	0.14940
83 S. lanzai	0.05163	0.06072	0.06504	0.06416	0.06418	0.05985	0.05985
84 Ch. lusitanica	0.39732	0.39019	0.38987	0.38315	0.38338	0.36920	0.36920
85 T. marmoratus	0.62242	0.59249	0.61424	0.55737	0.60028	0.57770	0.57770
86 M. luschani	0.21683	0.22035	0.22947	0.22584	0.24518	0.23516	0.23516
87 M. caucasica	0.60803	0.62274	0.59779	0.58490	0.54217	0.56221	0.56221
88 Eu. asper	0.40183	0.40940	0.39533	0.38838	0.38858	0.37538	0.37538
89 M._luschani-3	0.20016	0.18647	0.19461	0.19178	0.19183	0.18353	0.18353
90 M._luschani-4	0.20885	0.19483	0.20325	0.20017	0.20023	0.19163	0.19163
91 M._luschani-2	0.23206	0.23582	0.24540	0.24154	0.26189	0.25134	0.25134

Matriz de distancia HKY+I+G

	8	9	10	11	12	13	14
8 Trabada-1	-						
9 Trabada-2	0.00000	-					
10 Palacios_del_Sil	0.00273	0.00273	-				
11 Palacios_del_Sil	0.00273	0.00273	0.00000	-			
12 Arguenos-1	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	-		
13 Arguenos-2	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	0.00000	-	
14 Arguenos-3	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	0.00000	0.00000	-
15 Benasque-1	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	0.00000	0.00000	0.00000
16 Benasque-2	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	0.00000	0.00000	0.00000
17 Lanz-1	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	0.00000	0.00000	0.00000
18 Lanz-2	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	0.00000	0.00000	0.00000
19 Lindux-1	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	0.00000	0.00000	0.00000
20 Lindux-2	0.00841	0.00841	0.00553	0.00553	0.00000	0.00000	0.00000
21 Mijares-10H	0.01423	0.01423	0.01123	0.01123	0.00547	0.00547	0.00547
22 San Pablo	0.01137	0.01137	0.00841	0.00841	0.00273	0.00273	0.00273
23 Mijares-2	0.01137	0.01137	0.00841	0.00841	0.00273	0.00273	0.00273
24 Sierra Estrela	0.00846	0.00846	0.00555	0.00555	0.00555	0.00555	0.00555
25 Isoba-1	0.00831	0.00831	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547
26 Isoba-2	0.00831	0.00831	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547
27 Isoba-3	0.00831	0.00831	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547
28 Emb._del_Porma-1	0.00831	0.00831	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547
29 Emb._del_Porma-2	0.00831	0.00831	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547
30 Lillo_Bierzo-1	0.00831	0.00831	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547
31 Lillo_del_Bierzo	0.00831	0.00831	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547
32 Montseny	0.01137	0.01137	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841
33 Gresigne	0.01137	0.01137	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841
34 Setcasses	0.01137	0.01137	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841
35 Ucieda-1	0.00553	0.00553	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273
36 Ucieda-2	0.00553	0.00553	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273
37 Ucieda-3	0.00553	0.00553	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273
38 Ucieda-4	0.00553	0.00553	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273
39 Lillo_Bierzo-101	0.00553	0.00553	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273
40 Pto. Escudo	0.00553	0.00553	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273
41 San Mamede	0.01423	0.01423	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123
42 Sintra	0.01423	0.01423	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123
43 Cabezuelas	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831
44 Hervas	0.01123	0.01123	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831
45 Pto. ElPalo1	0.03118	0.03118	0.02766	0.02766	0.02766	0.02766	0.02766
46 Circo de Gredos	0.02050	0.02050	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732
47 Cinco Lagunas	0.02050	0.02050	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732
48 Pe?alara	0.02050	0.02050	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732
49 Laguna Los Pajar	0.02050	0.02050	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732
50 El Hornillo	0.02050	0.02050	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732
51 El Fito	0.02406	0.02406	0.02079	0.02079	0.02749	0.02749	0.02749
52 Luarca-1H	0.02350	0.02350	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028
53 Luarca-75H	0.02377	0.02377	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050
54 Oviedo-1	0.03374	0.03374	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022
55 Oviedo-2	0.03374	0.03374	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022
56 Oviedo-3	0.03374	0.03374	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022
57 Oviedo-4	0.03374	0.03374	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022
58 Cofi?al-69M	0.03373	0.03373	0.03022	0.03022	0.02350	0.02350	0.02350
59 Trabada-17M	0.02714	0.02714	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377
60 Amieva-27M	0.03022	0.03022	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681
61 Amieva-1	0.02350	0.02350	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028
62 Amieva-2	0.02350	0.02350	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028
63 R?o_Oza-1	0.02637	0.02637	0.02316	0.02316	0.02316	0.02316	0.02316
64 R?o_Oza-64M	0.02350	0.02350	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028
65 Monast._Hermo-1	0.03420	0.03420	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062
66 Monast._Hermo-2	0.03420	0.03420	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062
67 Monast._Hermo-3	0.03420	0.03420	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062
68 Villablinos-1	0.03420	0.03420	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062
69 Pto._Palo-48	0.03420	0.03420	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062
70 Sierra_Monchique	0.03036	0.03036	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692
71 Sierra_Monchique	0.03036	0.03036	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692
72 Santiago do Cace	0.03036	0.03036	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692
73 Sierra Morena	0.03060	0.03060	0.02713	0.02713	0.02713	0.02713	0.02713
74 Sierra Aracena	0.02714	0.02714	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377
75 Ri?par-1	0.02714	0.02714	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377
76 Ri?par-2	0.02714	0.02714	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377
77 Ba?os de la Enci	0.02714	0.02714	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377
78 Sierra_Grazalema	0.05705	0.05705	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286

79 Sierra_Grazalema	0.05705	0.05705	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286
80 Ronda	0.06056	0.06056	0.05631	0.05631	0.05631	0.05631	0.05631
81 S. atra	0.08551	0.08551	0.08066	0.08066	0.07598	0.07598	0.07598
82 S. algira	0.14940	0.14940	0.15669	0.15669	0.15669	0.15669	0.15669
83 S. lanzai	0.05985	0.05985	0.05567	0.05567	0.04768	0.04768	0.04768
84 Ch. lusitanica	0.36920	0.36920	0.35582	0.35582	0.36897	0.36897	0.36897
85 T. marmoratus	0.57770	0.57770	0.55669	0.55669	0.55669	0.55669	0.55669
86 M. luschani	0.23516	0.23516	0.22568	0.22568	0.20785	0.20785	0.20785
87 M. caucasica	0.56221	0.56221	0.58366	0.58366	0.58366	0.58366	0.58366
88 Eu. asper	0.37538	0.37538	0.36288	0.36288	0.38812	0.38812	0.38812
89 M._luschani-3	0.18353	0.18353	0.17557	0.17557	0.17557	0.17557	0.17557
90 M._luschani-4	0.19163	0.19163	0.18340	0.18340	0.18340	0.18340	0.18340
91 M._luschani-2	0.25134	0.25134	0.24136	0.24136	0.22261	0.22261	0.22261

Matriz de distancia HKY+I+G

	15	16	17	18	19	20	21
15 Benasque-1	-						
16 Benasque-2	0.00000	-					
17 Lanz-1	0.00000	0.00000	-				
18 Lanz-2	0.00000	0.00000	0.00000	-			
19 Lindux-1	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-		
20 Lindux-2	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
21 Mijares-10H	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	-
22 San Pablo	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00272
23 Mijares-2	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00272
24 Sierra Estrela	0.00555	0.00555	0.00555	0.00555	0.00555	0.00555	0.01128
25 Isoba-1	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.01115
26 Isoba-2	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.01115
27 Isoba-3	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.01115
28 Emb._del_Porma-1	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.01115
29 Emb._del_Porma-2	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.01115
30 Lillo_Bierzo-1	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.01115
31 Lillo_del_Bierzo	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.01115
32 Montseny	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.01423
33 Gresigne	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.01423
34 Setcasses	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.00841	0.01423
35 Ucieda-1	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00831
36 Ucieda-2	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00831
37 Ucieda-3	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00831
38 Ucieda-4	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00831
39 Lillo_Bierzo-101	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00831
40 Pto. Escudo	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00273	0.00831
41 San Mamede	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123	0.01715
42 Sintra	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123	0.01123	0.01715
43 Cabezuelas	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.01411
44 Hervas	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.01411
45 Pto. ElPalol	0.02766	0.02766	0.02766	0.02766	0.02766	0.02766	0.02732
46 Circo de Gredos	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01715
47 Cinco Lagunas	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01715
48 Pe?alara	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01715
49 Laguna Los Pajar	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01715
50 El Hornillo	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01715
51 El Fito	0.02749	0.02749	0.02749	0.02749	0.02749	0.02749	0.02722
52 Luarca-1H	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02012
53 Luarca-75M	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02028
54 Oviedo-1	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.02991
55 Oviedo-2	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.02991
56 Oviedo-3	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.02991
57 Oviedo-4	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.03022	0.02991
58 Cofi?al-69M	0.02350	0.02350	0.02350	0.02350	0.02350	0.02350	0.02329
59 Trabada-17M	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02350
60 Amieva-27M	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02655
61 Amieva-1	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02012
62 Amieva-2	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02012
63 R?o_Oza-1	0.02316	0.02316	0.02316	0.02316	0.02316	0.02316	0.02310
64 R?o_Oza-64M	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028	0.02012
65 Monast._Hermo-1	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03024
66 Monast._Hermo-2	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03024
67 Monast._Hermo-3	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03024
68 Villablinos-1	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03024
69 Pto._Palo-48	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03062	0.03024
70 Sierra_Monchique	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02666
71 Sierra_Monchique	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02666
72 Santiago do Cace	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02692	0.02666
73 Sierra Morena	0.02713	0.02713	0.02713	0.02713	0.02713	0.02713	0.02681
74 Sierra Aracena	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02350
75 Ri?par-1	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02350
76 Ri?par-2	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02350
77 Ba?os de la Enci	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02350
78 Sierra_Grazalema	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286	0.05219
79 Sierra_Grazalema	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286	0.05286	0.05219
80 Ronda	0.05631	0.05631	0.05631	0.05631	0.05631	0.05631	0.05566
81 S. atra	0.07598	0.07598	0.07598	0.07598	0.07598	0.07598	0.08459
82 S. algira	0.15669	0.15669	0.15669	0.15669	0.15669	0.15669	0.16938
83 S. lanzai	0.04768	0.04768	0.04768	0.04768	0.04768	0.04768	0.05509
84 Ch. lusitanica	0.36897	0.36897	0.36897	0.36897	0.36897	0.36897	0.39203
85 T. marmoratus	0.55669	0.55669	0.55669	0.55669	0.55669	0.55669	0.59036
86 M. luschani	0.20785	0.20785	0.20785	0.20785	0.20785	0.20785	0.20520
87 M. caucasica	0.58366	0.58366	0.58366	0.58366	0.58366	0.58366	0.62004
88 Eu. asper	0.38812	0.38812	0.38812	0.38812	0.38812	0.38812	0.41142
89 M._luschani-3	0.17557	0.17557	0.17557	0.17557	0.17557	0.17557	0.18897
90 M._luschani-4	0.18340	0.18340	0.18340	0.18340	0.18340	0.18340	0.19720
91 M._luschani-2	0.22261	0.22261	0.22261	0.22261	0.22261	0.22261	0.21980

Matriz de distancia HKY+I+G

	22	23	24	25	26	27	28
22 San Pablo	-						
23 Mijares-2	0.00000	-					
24 Sierra Estrela	0.00846	0.00846	-				
25 Isoba-1	0.00831	0.00831	0.00550	-			
26 Isoba-2	0.00831	0.00831	0.00550	0.00000	-		
27 Isoba-3	0.00831	0.00831	0.00550	0.00000	0.00000	-	
28 Emb._del_Porma-1	0.00831	0.00831	0.00550	0.00000	0.00000	0.00000	-
29 Emb._del_Porma-2	0.00831	0.00831	0.00550	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
30 Lillo_Bierzo-1	0.00831	0.00831	0.00550	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
31 Lillo_del_Bierzo	0.00831	0.00831	0.00550	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
32 Montseny	0.01137	0.01137	0.00846	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831
33 Gresigne	0.01137	0.01137	0.00846	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831
34 Setcasses	0.01137	0.01137	0.00846	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831
35 Ucieda-1	0.00553	0.00553	0.00273	0.00272	0.00272	0.00272	0.00272
36 Ucieda-2	0.00553	0.00553	0.00273	0.00272	0.00272	0.00272	0.00272
37 Ucieda-3	0.00553	0.00553	0.00273	0.00272	0.00272	0.00272	0.00272
38 Ucieda-4	0.00553	0.00553	0.00273	0.00272	0.00272	0.00272	0.00272
39 Lillo_Bierzo-101	0.00553	0.00553	0.00273	0.00272	0.00272	0.00272	0.00272
40 Pto. Escudo	0.00553	0.00553	0.00273	0.00272	0.00272	0.00272	0.00272
41 San Mamede	0.01423	0.01423	0.01128	0.01115	0.01115	0.01115	0.01115
42 Sintra	0.01423	0.01423	0.01128	0.01115	0.01115	0.01115	0.01115
43 Cabezuelas	0.01123	0.01123	0.00836	0.00828	0.00828	0.00828	0.00828
44 Hervas	0.01123	0.01123	0.00836	0.00828	0.00828	0.00828	0.00828
45 Pto. ElPalol	0.02421	0.02421	0.02777	0.02733	0.02733	0.02733	0.02733
46 Circo de Gredos	0.01423	0.01423	0.01743	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715

47 Cinco Lagunas	0.01423	0.01423	0.01743	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715
48 Pe?alara	0.01423	0.01423	0.01743	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715
49 Laguna Los Pajar	0.01423	0.01423	0.01743	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715
50 El Hornillo	0.01423	0.01423	0.01743	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715
51 El Fito	0.02406	0.02406	0.02754	0.02723	0.02723	0.02723	0.02723
52 Luarca-1H	0.01715	0.01715	0.02043	0.02012	0.02012	0.02012	0.02012
53 Luarca-75H	0.01732	0.01732	0.02063	0.02028	0.02028	0.02028	0.02028
54 Oviedo-1	0.02682	0.02682	0.03042	0.02991	0.02991	0.02991	0.02991
55 Oviedo-2	0.02682	0.02682	0.03042	0.02991	0.02991	0.02991	0.02991
56 Oviedo-3	0.02682	0.02682	0.03042	0.02991	0.02991	0.02991	0.02991
57 Oviedo-4	0.02682	0.02682	0.03042	0.02991	0.02991	0.02991	0.02991
58 Cofi?al-69M	0.02028	0.02028	0.03041	0.02991	0.02991	0.02991	0.02991
59 Trabada-17M	0.02050	0.02050	0.02396	0.02350	0.02350	0.02350	0.02350
60 Amieva-27M	0.02350	0.02350	0.02697	0.02655	0.02655	0.02655	0.02655
61 Amieva-1	0.01715	0.01715	0.02041	0.02012	0.02012	0.02012	0.02012
62 Amieva-2	0.01715	0.01715	0.02041	0.02012	0.02012	0.02012	0.02012
63 R?o_Oza-1	0.02004	0.02004	0.02334	0.02310	0.02310	0.02310	0.02310
64 R?o_Oza-64M	0.01715	0.01715	0.02040	0.02012	0.02012	0.02012	0.02012
65 Monast._Hermo-1	0.02715	0.02715	0.03087	0.03023	0.03023	0.03023	0.03023
66 Monast._Hermo-2	0.02715	0.02715	0.03087	0.03023	0.03023	0.03023	0.03023
67 Monast._Hermo-3	0.02715	0.02715	0.03087	0.03023	0.03023	0.03023	0.03023
68 Villablinos-1	0.02715	0.02715	0.03087	0.03023	0.03023	0.03023	0.03023
69 Pto._Palo-48	0.02715	0.02715	0.03087	0.03023	0.03023	0.03023	0.03023
70 Sierra_Monchique	0.02361	0.02361	0.02696	0.02667	0.02667	0.02667	0.02667
71 Sierra_Monchique	0.02361	0.02361	0.02696	0.02667	0.02667	0.02667	0.02667
72 Santiago do Cace	0.02361	0.02361	0.02696	0.02667	0.02667	0.02667	0.02667
73 Sierra Morena	0.02377	0.02377	0.02727	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681
74 Sierra Aracena	0.02050	0.02050	0.02391	0.02350	0.02350	0.02350	0.02350
75 Ri?par-1	0.02050	0.02050	0.02391	0.02350	0.02350	0.02350	0.02350
76 Ri?par-2	0.02050	0.02050	0.02391	0.02350	0.02350	0.02350	0.02350
77 Ba?os de la Enci	0.02050	0.02050	0.02391	0.02350	0.02350	0.02350	0.02350
78 Sierra_Grazalema	0.04881	0.04881	0.05311	0.05220	0.05220	0.05220	0.05220
79 Sierra_Grazalema	0.04881	0.04881	0.05311	0.05220	0.05220	0.05220	0.05220
80 Ronda	0.05220	0.05220	0.05659	0.05566	0.05566	0.05566	0.05566
81 S. atra	0.08068	0.08068	0.07750	0.07984	0.07984	0.07984	0.07984
82 S. algira	0.16422	0.16422	0.15773	0.15441	0.15441	0.15441	0.15441
83 S. lanzai	0.05162	0.05162	0.05592	0.05509	0.05509	0.05509	0.05509
84 Ch. lusitanica	0.38289	0.38289	0.35581	0.37815	0.37815	0.37815	0.37815
85 T. marmoratus	0.57770	0.57770	0.59578	0.59063	0.59063	0.59063	0.59063
86 M. luschani	0.19944	0.19944	0.20406	0.21063	0.21063	0.21063	0.21063
87 M. caucasica	0.60729	0.60729	0.59043	0.54938	0.54938	0.54938	0.54938
88 Eu. asper	0.40160	0.40160	0.38300	0.36598	0.36598	0.36598	0.36598
89 M._luschani-3	0.18353	0.18353	0.17201	0.18894	0.18894	0.18894	0.18894
90 M._luschani-4	0.19163	0.19163	0.17985	0.19717	0.19717	0.19717	0.19717
91 M._luschani-2	0.21379	0.21379	0.21868	0.22558	0.22558	0.22558	0.22558

Matriz de distancia HKY+I+G

	29	30	31	32	33	34	35
29 Emb._del_Porma-2	-						
30 Lillo_Bierzo-1	0.00000	-					
31 Lillo_del_Bierzo	0.00000	0.00000	-				
32 Montseny	0.00831	0.00831	0.00831	-			
33 Gresigne	0.00831	0.00831	0.00831	0.00000	-		
34 Setcasses	0.00831	0.00831	0.00831	0.00000	0.00000	-	
35 Ucieda-1	0.00272	0.00272	0.00272	0.00553	0.00553	0.00553	-
36 Ucieda-2	0.00272	0.00272	0.00272	0.00553	0.00553	0.00553	0.00000
37 Ucieda-3	0.00272	0.00272	0.00272	0.00553	0.00553	0.00553	0.00000
38 Ucieda-4	0.00272	0.00272	0.00272	0.00553	0.00553	0.00553	0.00000
39 Lillo_Bierzo-101	0.00272	0.00272	0.00272	0.00553	0.00553	0.00553	0.00000
40 Pto. Escudo	0.00272	0.00272	0.00272	0.00553	0.00553	0.00553	0.00000
41 San Mamede	0.01115	0.01115	0.01115	0.01423	0.01423	0.01423	0.00831
42 Sintra	0.01115	0.01115	0.01115	0.01423	0.01423	0.01423	0.00831
43 Cabezuelas	0.00828	0.00828	0.00828	0.01123	0.01123	0.01123	0.00547
44 Hervas	0.00828	0.00828	0.00828	0.01123	0.01123	0.01123	0.00547
45 Pto. ElPalo1	0.02733	0.02733	0.02733	0.03118	0.03118	0.03118	0.02424
46 Circo de Gredos	0.01715	0.01715	0.01715	0.02050	0.02050	0.02050	0.01423
47 Cinco Lagunas	0.01715	0.01715	0.01715	0.02050	0.02050	0.02050	0.01423
48 Pe?alara	0.01715	0.01715	0.01715	0.02050	0.02050	0.02050	0.01423
49 Laguna Los Pajar	0.01715	0.01715	0.01715	0.02050	0.02050	0.02050	0.01423
50 El Hornillo	0.01715	0.01715	0.01715	0.02050	0.02050	0.02050	0.01423
51 El Fito	0.02723	0.02723	0.02723	0.03096	0.03096	0.03096	0.02413
52 Luarca-1H	0.02012	0.02012	0.02012	0.02350	0.02350	0.02350	0.01715
53 Luarca-75H	0.02028	0.02028	0.02028	0.02377	0.02377	0.02377	0.01732
54 Oviedo-1	0.02991	0.02991	0.02991	0.03374	0.03374	0.03374	0.02681
55 Oviedo-2	0.02991	0.02991	0.02991	0.03374	0.03374	0.03374	0.02681
56 Oviedo-3	0.02991	0.02991	0.02991	0.03374	0.03374	0.03374	0.02681
57 Oviedo-4	0.02991	0.02991	0.02991	0.03374	0.03374	0.03374	0.02681
58 Cofi?al-69M	0.02991	0.02991	0.02991	0.03373	0.03373	0.03373	0.02681
59 Trabada-17M	0.02350	0.02350	0.02350	0.02714	0.02714	0.02714	0.02050
60 Amieva-27M	0.02655	0.02655	0.02655	0.03022	0.03022	0.03022	0.02349
61 Amieva-1	0.02012	0.02012	0.02012	0.02350	0.02350	0.02350	0.01715
62 Amieva-2	0.02012	0.02012	0.02012	0.02350	0.02350	0.02350	0.01715
63 R?o_Oza-1	0.02310	0.02310	0.02310	0.02637	0.02637	0.02637	0.02004
64 R?o_Oza-64M	0.02012	0.02012	0.02012	0.02350	0.02350	0.02350	0.01715
65 Monast._Hermo-1	0.03023	0.03023	0.03023	0.03420	0.03420	0.03420	0.02715
66 Monast._Hermo-2	0.03023	0.03023	0.03023	0.03420	0.03420	0.03420	0.02715
67 Monast._Hermo-3	0.03023	0.03023	0.03023	0.03420	0.03420	0.03420	0.02715
68 Villablinos-1	0.03023	0.03023	0.03023	0.03420	0.03420	0.03420	0.02715
69 Pto._Palo-48	0.03023	0.03023	0.03023	0.03420	0.03420	0.03420	0.02715
70 Sierra_Monchique	0.02667	0.02667	0.02667	0.03036	0.03036	0.03036	0.02358
71 Sierra_Monchique	0.02667	0.02667	0.02667	0.03036	0.03036	0.03036	0.02358
72 Santiago do Cace	0.02667	0.02667	0.02667	0.03036	0.03036	0.03036	0.02358
73 Sierra Morena	0.02681	0.02681	0.02681	0.03060	0.03060	0.03060	0.02377
74 Sierra Aracena	0.02350	0.02350	0.02350	0.02714	0.02714	0.02714	0.02050
75 Ri?par-1	0.02350	0.02350	0.02350	0.02714	0.02714	0.02714	0.02050
76 Ri?par-2	0.02350	0.02350	0.02350	0.02714	0.02714	0.02714	0.02050
77 Ba?os de la Enci	0.02350	0.02350	0.02350	0.02714	0.02714	0.02714	0.02050
78 Sierra_Grazalema	0.05220	0.05220	0.05220	0.05705	0.05705	0.05705	0.04879
79 Sierra_Grazalema	0.05220	0.05220	0.05220	0.05705	0.05705	0.05705	0.04879
80 Ronda	0.05566	0.05566	0.05566	0.06056	0.06056	0.06056	0.05219
81 S. atra	0.07984	0.07984	0.07984	0.08551	0.08551	0.08551	0.07597
82 S. algira	0.15441	0.15441	0.15441	0.16422	0.16422	0.16422	0.14941
83 S. lanzai	0.05509	0.05509	0.05509	0.05985	0.05985	0.05985	0.05161
84 Ch. lusitanica	0.37815	0.37815	0.37815	0.36920	0.36920	0.36920	0.36870
85 T. marmoratus	0.59063	0.59063	0.59063	0.57770	0.57770	0.57770	0.57700
86 M. luschani	0.21063	0.21063	0.21063	0.21668	0.21668	0.21668	0.21654
87 M. caucasica	0.54938	0.54938	0.54938	0.56221	0.56221	0.56221	0.56109
88 Eu. asper	0.36598	0.36598	0.36598	0.40160	0.40160	0.40160	0.37515
89 M._luschani-3	0.18894	0.18894	0.18894	0.18353	0.18353	0.18353	0.18334
90 M._luschani-4	0.19717	0.19717	0.19717	0.19163	0.19163	0.19163	0.19143
91 M._luschani-2	0.22558	0.22558	0.22558	0.23190	0.23190	0.23190	0.23174

Matriz de distancia HKY+I+G

	36	37	38	39	40	41	42
36 Ucieda-2	-						
37 Ucieda-3	0.00000	-					
38 Ucieda-4	0.00000	0.00000	-				
39 Lillo_Bierzo-101	0.00000	0.00000	0.00000	-			
40 Pto. Escudo	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-		
41 San Mamede	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	-	
42 Sintra	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00831	0.00000	-
43 Cabezuelas	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00273	0.00273
44 Hervas	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00547	0.00273	0.00273
45 Pto. ElPalo1	0.02424	0.02424	0.02424	0.02424	0.02424	0.03439	0.03439
46 Circo de Gredos	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01715	0.01715
47 Cinco Lagunas	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01715	0.01715
48 Pe?alara	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01715	0.01715
49 Laguna Los Pajar	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01715	0.01715
50 El Hornillo	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01423	0.01715	0.01715
51 El Fito	0.02413	0.02413	0.02413	0.02413	0.02413	0.03422	0.03422
52 Luarca-1H	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715	0.02656	0.02656
53 Luarca-75H	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.01732	0.02681	0.02681
54 Oviedo-1	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.03693	0.03693
55 Oviedo-2	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.03693	0.03693
56 Oviedo-3	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.03693	0.03693
57 Oviedo-4	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.03693	0.03693
58 Cofi?al-69M	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.02681	0.03692	0.03692
59 Trabada-17M	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.03023	0.03023
60 Amieva-27M	0.02349	0.02349	0.02349	0.02349	0.02349	0.03336	0.03336
61 Amieva-1	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715	0.02656	0.02656
62 Amieva-2	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715	0.02656	0.02656
63 R?o_Oza-1	0.02004	0.02004	0.02004	0.02004	0.02004	0.02951	0.02951
64 R?o_Oza-64M	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715	0.01715	0.02655	0.02655
65 Monast._Hermo-1	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.03737	0.03737
66 Monast._Hermo-2	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.03737	0.03737
67 Monast._Hermo-3	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.03737	0.03737
68 Villablinos-1	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.03737	0.03737
69 Pto._Palo-48	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715	0.03737	0.03737
70 Sierra_Monchique	0.02358	0.02358	0.02358	0.02358	0.02358	0.03352	0.03352
71 Sierra_Monchique	0.02358	0.02358	0.02358	0.02358	0.02358	0.03352	0.03352
72 Santiago do Cace	0.02358	0.02358	0.02358	0.02358	0.02358	0.03352	0.03352
73 Sierra Morena	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377	0.03373	0.03373
74 Sierra Aracena	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.03022	0.03022
75 Ri?par-1	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.03022	0.03022
76 Ri?par-2	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.03022	0.03022
77 Ba?os de la Enci	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.02050	0.03022	0.03022
78 Sierra_Grazalema	0.04879	0.04879	0.04879	0.04879	0.04879	0.06057	0.06057
79 Sierra_Grazalema	0.04879	0.04879	0.04879	0.04879	0.04879	0.06057	0.06057
80 Ronda	0.05219	0.05219	0.05219	0.05219	0.05219	0.06414	0.06414
81 S. atra	0.07597	0.07597	0.07597	0.07597	0.07597	0.08951	0.08951
82 S. algira	0.14941	0.14941	0.14941	0.14941	0.14941	0.15449	0.15449
83 S. lanzai	0.05161	0.05161	0.05161	0.05161	0.05161	0.06344	0.06344
84 Ch. lusitanica	0.36870	0.36870	0.36870	0.36870	0.36870	0.37837	0.37837
85 T. marmoratus	0.57700	0.57700	0.57700	0.57700	0.57700	0.63624	0.63624
86 M. luschani	0.21654	0.21654	0.21654	0.21654	0.21654	0.24172	0.24172
87 M. caucasica	0.56109	0.56109	0.56109	0.56109	0.56109	0.53279	0.53279
88 Eu. asper	0.37515	0.37515	0.37515	0.37515	0.37515	0.41176	0.41176
89 M._luschani-3	0.18334	0.18334	0.18334	0.18334	0.18334	0.20583	0.20583
90 M._luschani-4	0.19143	0.19143	0.19143	0.19143	0.19143	0.21466	0.21466
91 M._luschani-2	0.23174	0.23174	0.23174	0.23174	0.23174	0.25819	0.25819

Matriz de distancia HKY+I+G)

	43	44	45	46	47	48	49
43 Cabezuelas	-						
44 Hervas	0.00000	-					
45 Pto. ElPalo1	0.03079	0.03079	-				
46 Circo de Gredos	0.01411	0.01411	0.03166	-			
47 Cinco Lagunas	0.01411	0.01411	0.03166	0.00000	-		
48 Pe?alara	0.01411	0.01411	0.03166	0.00000	0.00000	-	
49 Laguna Los Pajar	0.01411	0.01411	0.03166	0.00000	0.00000	0.00000	-
50 El Hornillo	0.01411	0.01411	0.03166	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
51 El Fito	0.03064	0.03064	0.03113	0.02434	0.02434	0.02434	0.02434
52 Luarca-1H	0.02330	0.02330	0.01760	0.02378	0.02378	0.02378	0.02378
53 Luarca-75H	0.02350	0.02350	0.02457	0.02412	0.02412	0.02412	0.02412
54 Oviedo-1	0.03338	0.03338	0.03481	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715
55 Oviedo-2	0.03338	0.03338	0.03481	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715
56 Oviedo-3	0.03338	0.03338	0.03481	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715
57 Oviedo-4	0.03338	0.03338	0.03481	0.02715	0.02715	0.02715	0.02715
58 Cofi?al-69M	0.03337	0.03337	0.03473	0.03418	0.03418	0.03418	0.03418
59 Trabada-17M	0.02682	0.02682	0.00851	0.02755	0.02755	0.02755	0.02755
60 Amieva-27M	0.02991	0.02991	0.03110	0.03061	0.03061	0.03061	0.03061
61 Amieva-1	0.02330	0.02330	0.02421	0.02378	0.02378	0.02378	0.02378
62 Amieva-2	0.02330	0.02330	0.02421	0.02378	0.02378	0.02378	0.02378
63 R?o_Oza-1	0.02626	0.02626	0.02698	0.02330	0.02330	0.02330	0.02330
64 R?o_Oza-64M	0.02329	0.02329	0.02421	0.02377	0.02377	0.02377	0.02377
65 Monast._Hermo-1	0.03376	0.03376	0.00275	0.03472	0.03472	0.03472	0.03472
66 Monast._Hermo-2	0.03376	0.03376	0.00275	0.03472	0.03472	0.03472	0.03472
67 Monast._Hermo-3	0.03376	0.03376	0.00275	0.03472	0.03472	0.03472	0.03472
68 Villablinos-1	0.03376	0.03376	0.00275	0.03472	0.03472	0.03472	0.03472
69 Pto._Palo-48	0.03376	0.03376	0.00275	0.03472	0.03472	0.03472	0.03472
70 Sierra_Monchique	0.03006	0.03006	0.03869	0.02061	0.02061	0.02061	0.02061
71 Sierra_Monchique	0.03006	0.03006	0.03869	0.02061	0.02061	0.02061	0.02061
72 Santiago do Cace	0.03006	0.03006	0.03869	0.02061	0.02061	0.02061	0.02061
73 Sierra Morena	0.03022	0.03022	0.04313	0.02079	0.02079	0.02079	0.02079
74 Sierra Aracena	0.02681	0.02681	0.03918	0.01756	0.01756	0.01756	0.01756
75 Ri?par-1	0.02681	0.02681	0.03918	0.01756	0.01756	0.01756	0.01756
76 Ri?par-2	0.02681	0.02681	0.03918	0.01756	0.01756	0.01756	0.01756
77 Ba?os de la Enci	0.02681	0.02681	0.03918	0.01756	0.01756	0.01756	0.01756
78 Sierra_Grazalema	0.05633	0.05633	0.06341	0.05363	0.05363	0.05363	0.05363
79 Sierra_Grazalema	0.05633	0.05633	0.06341	0.05363	0.05363	0.05363	0.05363
80 Ronda	0.05985	0.05985	0.06703	0.05707	0.05707	0.05707	0.05707
81 S. atra	0.08462	0.08462	0.09545	0.07686	0.07686	0.07686	0.07686
82 S. algira	0.16189	0.16189	0.17581	0.17482	0.17482	0.17482	0.17482
83 S. lanzai	0.05922	0.05922	0.07571	0.05635	0.05635	0.05635	0.05635
84 Ch. lusitanica	0.36522	0.36522	0.41157	0.36062	0.36062	0.36062	0.36062
85 T. marmoratus	0.61365	0.61365	0.73147	0.66072	0.66072	0.66072	0.66072
86 M. luschani	0.23223	0.23223	0.25018	0.20223	0.20223	0.20223	0.20223
87 M. caucasica	0.55401	0.55401	0.59511	0.57261	0.57261	0.57261	0.57261
88 Eu. asper	0.39828	0.39828	0.44543	0.42609	0.42609	0.42609	0.42609
89 M._luschani-3	0.19737	0.19737	0.24227	0.19454	0.19454	0.19454	0.19454
90 M._luschani-4	0.20590	0.20590	0.25283	0.20309	0.20309	0.20309	0.20309
91 M._luschani-2	0.24822	0.24822	0.26735	0.21676	0.21676	0.21676	0.21676

Matriz de distancia HKY+I+G

	50	51	52	53	54	55	56
50 El Hornillo	-						
51 El Fito	0.02434	-					
52 Luarca-1H	0.02378	0.02398	-				
53 Luarca-75H	0.02412	0.00847	0.01732	-			
54 Oviedo-1	0.02715	0.00562	0.02682	0.00831	-		
55 Oviedo-2	0.02715	0.00562	0.02682	0.00831	0.00000	-	
56 Oviedo-3	0.02715	0.00562	0.02682	0.00831	0.00000	0.00000	-
57 Oviedo-4	0.02715	0.00562	0.02682	0.00831	0.00000	0.00000	0.00000
58 Cofi?al-69M	0.03418	0.02398	0.02682	0.01423	0.02350	0.02350	0.02350
59 Trabada-17M	0.02755	0.02768	0.01424	0.02080	0.03062	0.03062	0.03062
60 Amieva-27M	0.03061	0.02069	0.02350	0.01123	0.02028	0.02028	0.02028
61 Amieva-1	0.02378	0.01439	0.01715	0.00548	0.01411	0.01411	0.01411
62 Amieva-2	0.02378	0.01439	0.01715	0.00548	0.01411	0.01411	0.01411
63 R?o_Oza-1	0.02330	0.02354	0.00828	0.02013	0.02637	0.02637	0.02637
64 R?o_Oza-64M	0.02377	0.02405	0.00553	0.01732	0.02682	0.02682	0.02682
65 Monast._Hermo-1	0.03472	0.03483	0.02051	0.02756	0.03789	0.03789	0.03789
66 Monast._Hermo-2	0.03472	0.03483	0.02051	0.02756	0.03789	0.03789	0.03789
67 Monast._Hermo-3	0.03472	0.03483	0.02051	0.02756	0.03789	0.03789	0.03789
68 Villablínos-1	0.03472	0.03483	0.02051	0.02756	0.03789	0.03789	0.03789
69 Pto._Palo-48	0.03472	0.03483	0.02051	0.02756	0.03789	0.03789	0.03789
70 Sierra_Monchique	0.02061	0.02764	0.03393	0.02728	0.03040	0.03040	0.03040
71 Sierra_Monchique	0.02061	0.02764	0.03393	0.02728	0.03040	0.03040	0.03040
72 Santiago do Cace	0.02061	0.02764	0.03393	0.02728	0.03040	0.03040	0.03040
73 Sierra Morena	0.02079	0.02784	0.03417	0.02753	0.03061	0.03061	0.03061
74 Sierra Aracena	0.01756	0.02434	0.03061	0.02411	0.02715	0.02715	0.02715
75 Ri?par-1	0.01756	0.02434	0.03061	0.02411	0.02715	0.02715	0.02715
76 Ri?par-2	0.01756	0.02434	0.03061	0.02411	0.02715	0.02715	0.02715
77 Ba?os de la Enci	0.01756	0.02434	0.03061	0.02411	0.02715	0.02715	0.02715
78 Sierra_Grazalema	0.05363	0.07234	0.06139	0.06226	0.07517	0.07517	0.07517
79 Sierra_Grazalema	0.05363	0.07234	0.06139	0.06226	0.07517	0.07517	0.07517
80 Ronda	0.05707	0.07610	0.06496	0.06582	0.07893	0.07893	0.07893
81 S. atra	0.07686	0.09484	0.09568	0.09683	0.10102	0.10102	0.10102
82 S. algira	0.17482	0.19155	0.17194	0.17471	0.19719	0.19719	0.19719
83 S. lanzai	0.05635	0.07527	0.07318	0.07412	0.06862	0.06862	0.06862
84 Ch. lusitanica	0.36062	0.34853	0.36970	0.37384	0.37906	0.37906	0.37906
85 T. marmoratus	0.66072	0.60282	0.65079	0.61313	0.65143	0.65143	0.65143
86 M. luschani	0.20223	0.23836	0.22589	0.22892	0.24522	0.24522	0.24522
87 M. caucasica	0.57261	0.63878	0.58537	0.59458	0.63330	0.63330	0.63330
88 Eu. asper	0.42609	0.40384	0.45144	0.41172	0.43672	0.43672	0.43672
89 M._luschani-3	0.19454	0.19343	0.20031	0.20311	0.21817	0.21817	0.21817
90 M._luschani-4	0.20309	0.20225	0.20899	0.21194	0.22747	0.22747	0.22747
91 M._luschani-2	0.21676	0.25500	0.24160	0.24482	0.26194	0.26194	0.26194

Matriz de distancia HKY+I+G

	57	58	59	60	61	62	63
57 Oviedo-4	-						
58 Cofi?al-69M	0.02350	-					
59 Trabada-17M	0.03062	0.03062	-				
60 Amieva-27M	0.02028	0.00273	0.02715	-			
61 Amieva-1	0.01411	0.00841	0.02051	0.00553	-		
62 Amieva-2	0.01411	0.00841	0.02051	0.00553	0.00000	-	
63 R?o_Oza-1	0.02637	0.02968	0.02330	0.02637	0.02004	0.02004	-
64 R?o_Oza-64M	0.02682	0.02681	0.02051	0.02350	0.01715	0.01715	0.00828
65 Monast._Hermo-1	0.03789	0.03788	0.00553	0.03420	0.02716	0.02716	0.02993
66 Monast._Hermo-2	0.03789	0.03788	0.00553	0.03420	0.02716	0.02716	0.02993
67 Monast._Hermo-3	0.03789	0.03788	0.00553	0.03420	0.02716	0.02716	0.02993
68 Villablínos-1	0.03789	0.03788	0.00553	0.03420	0.02716	0.02716	0.02993
69 Pto._Palo-48	0.03789	0.03788	0.00553	0.03420	0.02716	0.02716	0.02993
70 Sierra_Monchique	0.03040	0.03762	0.03441	0.03397	0.02695	0.02695	0.03330
71 Sierra_Monchique	0.03040	0.03762	0.03441	0.03397	0.02695	0.02695	0.03330
72 Santiago do Cace	0.03040	0.03762	0.03441	0.03397	0.02695	0.02695	0.03330
73 Sierra Morena	0.03061	0.03784	0.03843	0.03416	0.02714	0.02714	0.03337
74 Sierra Aracena	0.02715	0.03417	0.03470	0.03060	0.02377	0.02377	0.02992
75 Ri?par-1	0.02715	0.03417	0.03470	0.03060	0.02377	0.02377	0.02992
76 Ri?par-2	0.02715	0.03417	0.03470	0.03060	0.02377	0.02377	0.02992
77 Ba?os de la Enci	0.02715	0.03417	0.03470	0.03060	0.02377	0.02377	0.02992
78 Sierra_Grazalema	0.07517	0.07512	0.06682	0.07038	0.06137	0.06137	0.06416
79 Sierra_Grazalema	0.07517	0.07512	0.06682	0.07038	0.06137	0.06137	0.06416
80 Ronda	0.07893	0.07889	0.07045	0.07408	0.06494	0.06494	0.06781
81 S. atra	0.10102	0.10644	0.10230	0.10641	0.09566	0.09566	0.09361
82 S. algira	0.19719	0.19676	0.18302	0.18809	0.17195	0.17195	0.17461
83 S. lanzai	0.06862	0.07788	0.07896	0.08272	0.07317	0.07317	0.07154
84 Ch. lusitanica	0.37906	0.36494	0.37474	0.36463	0.35160	0.35160	0.35654
85 T. marmoratus	0.65143	0.65020	0.63755	0.67404	0.65030	0.65030	0.60490
86 M. luschani	0.24522	0.23515	0.25910	0.24477	0.22580	0.22580	0.20802
87 M. caucasica	0.63330	0.70792	0.55216	0.67945	0.62874	0.62874	0.55996
88 Eu. asper	0.43672	0.45121	0.45642	0.43608	0.42193	0.42193	0.43015
89 M._luschani-3	0.21817	0.18080	0.23124	0.18885	0.18896	0.18896	0.19184
90 M._luschani-4	0.22747	0.18891	0.24105	0.19723	0.19736	0.19736	0.20023
91 M._luschani-2	0.26194	0.24145	0.27661	0.25122	0.24149	0.24149	0.22282

Matriz de distancia HKY+I+G

	64	65	66	67	68	69	70
64 R?o_Oza-64M	-						
65 Monast._Hermo-1	0.02715	-					
66 Monast._Hermo-2	0.02715	0.00000	-				
67 Monast._Hermo-3	0.02715	0.00000	0.00000	-			
68 Villablínos-1	0.02715	0.00000	0.00000	0.00000	-		
69 Pto._Palo-48	0.02715	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
70 Sierra_Monchique	0.03390	0.04197	0.04197	0.04197	0.04197	0.04197	-
71 Sierra_Monchique	0.03390	0.04197	0.04197	0.04197	0.04197	0.04197	0.00000
72 Santiago do Cace	0.03390	0.04197	0.04197	0.04197	0.04197	0.04197	0.00000
73 Sierra Morena	0.03417	0.04627	0.04627	0.04627	0.04627	0.04627	0.02388
74 Sierra Aracena	0.03060	0.04231	0.04231	0.04231	0.04231	0.04231	0.02061
75 Ri?par-1	0.03060	0.04231	0.04231	0.04231	0.04231	0.04231	0.02061
76 Ri?par-2	0.03060	0.04231	0.04231	0.04231	0.04231	0.04231	0.02061
77 Ba?os de la Enci	0.03060	0.04231	0.04231	0.04231	0.04231	0.04231	0.02061
78 Sierra_Grazalema	0.06136	0.06688	0.06688	0.06688	0.06688	0.06688	0.06646
79 Sierra_Grazalema	0.06136	0.06688	0.06688	0.06688	0.06688	0.06688	0.06646
80 Ronda	0.06493	0.07051	0.07051	0.07051	0.07051	0.07051	0.07013
81 S. atra	0.08551	0.10239	0.10239	0.10239	0.10239	0.10239	0.09817
82 S. algira	0.17191	0.18338	0.18338	0.18338	0.18338	0.18338	0.19946
83 S. lanzai	0.07316	0.07903	0.07903	0.07903	0.07903	0.07903	0.06908
84 Ch. lusitanica	0.36916	0.38967	0.38967	0.38967	0.38967	0.38967	0.40879
85 T. marmoratus	0.60407	0.68863	0.68863	0.68863	0.68863	0.68863	0.62663
86 M. luschani	0.22571	0.25957	0.25957	0.25957	0.25957	0.25957	0.22319
87 M. caucasica	0.58406	0.55401	0.55401	0.55401	0.55401	0.55401	0.52545
88 Eu. asper	0.42177	0.45714	0.45714	0.45714	0.45714	0.45714	0.41248
89 M._luschani-3	0.20007	0.25193	0.25193	0.25193	0.25193	0.25193	0.21547
90 M._luschani-4	0.20874	0.26250	0.26250	0.26250	0.26250	0.26250	0.22483
91 M._luschani-2	0.24139	0.27713	0.27713	0.27713	0.27713	0.27713	0.23895

Matriz de distancia HKY+I+G

	71	72	73	74	75	76	77
71 Sierra_Monchique	-						
72 Santiago do Cace	0.00000	-					
73 Sierra Morena	0.02388	0.02388	-				
74 Sierra Aracena	0.02061	0.02061	0.00273	-			

75 Ri?par-1	0.02061	0.02061	0.00273	0.00000	-		
76 Ri?par-2	0.02061	0.02061	0.00273	0.00000	0.00000	-	
77 Ba?os de la Enci	0.02061	0.02061	0.00273	0.00000	0.00000	0.00000	-
78 Sierra_Grazalema	0.06646	0.06646	0.06676	0.06226	0.06226	0.06226	0.06226
79 Sierra_Grazalema	0.06646	0.06646	0.06676	0.06226	0.06226	0.06226	0.06226
80 Ronda	0.07013	0.07013	0.07039	0.06582	0.06582	0.06582	0.06582
81 S. atra	0.09817	0.09817	0.10220	0.09683	0.09683	0.09683	0.09683
82 S. algira	0.19946	0.19946	0.18292	0.19146	0.19146	0.19146	0.19146
83 S. lanzai	0.06908	0.06908	0.06946	0.06496	0.06496	0.06496	0.06496
84 Ch. lusitanica	0.40879	0.40879	0.36019	0.37388	0.37388	0.37388	0.37388
85 T. marmoratus	0.62663	0.62663	0.65952	0.68498	0.68498	0.68498	0.68498
86 M. luschani	0.22319	0.22319	0.20203	0.21073	0.21073	0.21073	0.21073
87 M. caucasica	0.52545	0.52545	0.57134	0.57197	0.57197	0.57197	0.57197
88 Eu. asper	0.41248	0.41248	0.39798	0.41172	0.41172	0.41172	0.41172
89 M._luschani-3	0.21547	0.21547	0.19435	0.18616	0.18616	0.18616	0.18616
90 M._luschani-4	0.22483	0.22483	0.20288	0.19441	0.19441	0.19441	0.19441
91 M._luschani-2	0.23895	0.23895	0.21654	0.22569	0.22569	0.22569	0.22569

Matriz de distancia HKY+I+G

	78	79	80	81	82	83	84
78 Sierra_Grazalema	-						
79 Sierra_Grazalema	0.00000	-					
80 Ronda	0.00272	0.00272	-				
81 S. atra	0.08543	0.08543	0.08942	-			
82 S. algira	0.17158	0.17158	0.17683	0.16937	-		
83 S. lanzai	0.07779	0.07779	0.08163	0.06699	0.13189	-	
84 Ch. lusitanica	0.45790	0.45790	0.46872	0.40013	0.43802	0.36328	-
85 T. marmoratus	0.69690	0.69690	0.68146	0.66318	0.62090	0.63004	0.52501
86 M. luschani	0.28662	0.28662	0.29388	0.27778	0.34486	0.19099	0.31323
87 M. caucasica	0.55933	0.55933	0.57183	0.56373	0.51208	0.51821	0.58439
88 Eu. asper	0.45011	0.45011	0.46105	0.43413	0.61186	0.43540	0.56922
89 M._luschani-3	0.25632	0.25632	0.26302	0.17038	0.30942	0.17813	0.28077
90 M._luschani-4	0.26694	0.26694	0.27382	0.17789	0.32209	0.18592	0.27027
91 M._luschani-2	0.30549	0.30549	0.31310	0.29604	0.36690	0.20488	0.31649

Matriz de distancia HKY+I+G

	85	86	87	88	89	90	91
85 T. marmoratus	-						
86 M. luschani	0.50748	-					
87 M. caucasica	0.62363	0.63242	-				
88 Eu. asper	0.44785	0.54516	0.71572	-			
89 M._luschani-3	0.57312	0.15214	0.64606	0.54257	-		
90 M._luschani-4	0.55204	0.14511	0.62060	0.54233	0.00274	-	
91 M._luschani-2	0.49559	0.00547	0.64579	0.53250	0.15697	0.14984	-

III- ONTOGENIA Y VIVIPARISMO

1. Introducción

La biología del desarrollo ha recuperado en las últimas décadas un papel protagonista en los estudios evolutivos. La trascendencia de esta nueva síntesis entre evolución y desarrollo radica en sus contribuciones al estudio de los patrones de la diversidad morfológica partiendo de paradigmas, conceptos y metodologías nuevos.

La idea del desarrollo como motor evolutivo, aunque mucho más antigua, vuelve a cobrar relevancia a partir de trabajos como los de GOULD (1977) y ALBERCH *et al.* (1979) entre otros, en los que se presenta un marco teórico con el que analizar desde un punto de vista evolutivo el problema del cambio morfológico entre linajes, profundizando en la relación entre la ontogenia y la filogenia de los organismos. La aproximación adaptacionista (generación continua de variantes con diferentes valores adaptativos, variantes que son posteriormente seleccionadas) no parece suficiente, según estos autores, para explicar la aparición de nuevas morfologías o de novedades evolutivas en la naturaleza. La selección natural sería la responsable de la adaptación ecológica de los individuos a su entorno, pero no de su evolución morfológica supraespecífica. Para entender estos fenómenos, la nueva aproximación adopta una perspectiva de análisis internalista: alteraciones simples de los procesos dinámicos del desarrollo, sobre todo en lo que se refiere a su regulación, pueden resultar en unos cambios morfológicos notables sin necesidad de recurrir a determinadas presiones selectivas externas. Si la aproximación adaptacionista asume que la evolución puede ser explicada por cambios en las frecuencias alélicas de las poblaciones y se limita a cuantificar con técnicas morfométricas el cambio fenotípico, la nueva aproximación internalista resalta la importancia de analizar los mecanismos ontogénicos por los que este cambio se produce. El nuevo enfoque se ha visto impelido por los avances de la biología molecular, que han permitido identificar los genes implicados directamente en los procesos morfogénicos, así como analizar cómo se produce la regulación de los mismos, pudiéndose ahondar aún más en el conocimiento del control genético y epigenético de los programas de desarrollo.

¿Qué es una ontogenia?

Los organismos tienen una estructura temporal, que viene marcada por un inicio, la formación del cigoto, y un final, la muerte. Durante este espacio de tiempo, no importa su duración, los organismos se transforman. Hay etapas de la vida en las que las transformaciones son más acusadas, como puede ser la etapa embrionaria, mientras que en otras las transformaciones son menos drásticas, como en la vida adulta. La ontogenia es ésta secuencia de cambios o de transformaciones que se producen a lo largo de la vida de un organismo (ROSAS, 1989).

Como hemos recordado en la introducción general del trabajo, en la actualidad ya no se entiende la ontogenia como un sistema cerrado y determinista, condicionado básicamente por el código genético, sino que estaríamos tratando con un programa de desarrollo definido como "un conjunto de reglas morfogenéticas que determinan la estructura y los cauces de variación de las entidades biológicas" (ROSAS

& Buscalioni, 1997). Se trata de un proceso dinámico y complejo, cuyo resultado es un fenotipo en continuo cambio.

La idea básica de los estudios evolutivos del desarrollo es el análisis de variabilidad morfológica que se observa en la naturaleza, tanto en lo que se refiere a su origen como a su organización, a partir del estudio comparado de la ontogenia de los organismos. Para ello, es necesario transformar la información contenida en los programas de desarrollo de forma que sea susceptible de comparación. Hay varias formas de representar las ontogenias para su análisis. Podemos expresar la ontogenia como una secuencia de eventos discretos que ocurren en un eje temporal (Alberch, 1985; Smith, 2001). Podemos definir el inicio y el final de cada evento y comparar las secuencias entre diferentes individuos. Para poder extraer una información válida de esta comparación, la secuencia de desarrollo tiene que cumplir ciertos requisitos. En primer lugar, hay que asegurarse de que los eventos de desarrollo de las secuencias son homólogos. Por otra parte, no basta con que los eventos de las secuencias se sucedan en el tiempo (serie temporal) sino que tiene que existir una relación de causalidad entre ellos (serie causal): la aparición de un determinado evento o estado es un requisito necesario para la aparición del siguiente evento de la serie.

Una segunda manera de transformar la información contenida en las ontogenias fue propuesta por Alberch *et al.* (1979), quienes introdujeron un método cuantitativo basado en la percepción del desarrollo como una "trayectoria ontogenética" (Rosas, 1989). Estos autores, siguiendo un modelo inicial planteado por Gould (1977) ("Esquema en reloj"), proponen la definición de cada evento de la ontogenia a partir de tres variables: el tiempo (inicio y final de los eventos), el tamaño y la forma. Podemos, entonces, representar la trayectoria ontogenética de cada evento (la formación de un órgano o una estructura, por ejemplo) en un espacio tridimensional tamaño-forma-tiempo y comparar las trayectorias del mismo evento entre diferentes individuos. Las diferencias morfológicas entre individuos o linajes podrán ser explicadas y analizadas a partir de las perturbaciones de sus trayectorias ontogenéticas, perturbaciones que implican diferencias en el inicio o final de los eventos (alteración de la variable tiempo), diferencias en las tasas de desarrollo (alteración de la variable forma), diferencias en las tasas de crecimiento (alteración de la variable tamaño) o una combinación de estos factores. El análisis de estas perturbaciones se enmarca dentro de lo que hoy se conoce como el análisis de heterocronías.

El concepto de heterocronía

El análisis de las heterocronías ha sido (y es) una de las referencias claves dentro de este tipo de aproximación internalista. La idea del análisis de las heterocronías surge como un formalismo potencialmente capaz de explicar teóricamente la relación entre dos fenotipos filogenéticamente relacionados (Rice, 1997) a través de la propuesta de un modelo metodológico con el que analizar y predecir los patrones de organización y de transformación de morfologías específicas (Alberch & Blanco, 1996).

El término heterocronía fue acuñado por primera vez por Haeckel en 1866 en el contexto de su ley biogenética ("La ontogenia de un individuo recapitula su filogenia"

[ver GOULD, 1977]), refiriéndose al cambio en el tiempo de desarrollo de un órgano o elemento con respecto a otro en un mismo individuo. Con este término, Haeckel describía una serie de fenómenos que no encajaban dentro de su planteamiento recapitulatorio, ya que, en su esquema, la filogenia era la causa mecánica de la ontogenia (ROSAS, 1989).

El sentido que en la actualidad se le da al término heterocronía lo inició DE BEER (1930; 1958). Este autor retoma el término, pero refiriéndose a él como el cambio en el tiempo de aparición de un órgano en una ontogenia con respecto a la aparición de ese mismo órgano en una ontogenia ancestral. Pretendió separar el concepto de heterocronía del concepto haeckeliano de recapitulación. Hay dos argumentos en los que de Beer hace especial hincapié en sus trabajos: (i) la posibilidad de que las heterocronías se produzcan en cualquier momento de la secuencia ontogénica, lo que se enfrenta frontalmente con la idea de recapitulación y (ii) el sentido mecanicista que le dio a sus interpretaciones gracias al mayor conocimiento que se tenía en su época del control genético del desarrollo. Para de Beer, además, las heterocronías, más que una excepción en el proceso ontogénico como en el caso haeckeliano, constituyen la regla que permite explicar un gran número de fenómenos evolutivos.

GOULD (1977) fue quizás el responsable de la popularización del término y de sus aplicaciones en biología evolutiva. A diferencia de de Beer, que pretendió refutar en cierto sentido la idea de recapitulación, Gould se interesa más en la abundancia de ejemplos de recapitulación en la naturaleza y de su explicación a través de las heterocronías. Este autor hace especial énfasis en la utilidad de los estudios de heterocronías en un contexto microevolutivo o poblacional y sujetos a análisis dentro del paradigma neodarwinista adaptacionista vigente (en contraposición con la visión macroevolutiva de las heterocronías, que toma un enfoque internalista en cierta manera incompatible) (ALBERCH, 1995; REILLY *et al.*, 1997). Gould restringe la definición de heterocronía de de Beer, proponiendo que se utilice exclusivamente cuando el cambio temporal en la secuencia ontogénica resulte en una relación directa entre ontogenia y filogenia. Esta interpretación acota los casos de heterocronías a los fenómenos de recapitulación; las perturbaciones heterocrónicas ocurridas durante el desarrollo tienen como resultado una secuencia filogenética particular. Para Gould, por tanto, la heterocronía es el mecanismo que genera esta relación directa entre ontogenia y filogenia.

Las heterocronías son, como hemos visto, cambios en una ontogenia con respecto a otra ontogenia ancestral y podemos analizarlas a partir de las variables con las que definíamos las trayectorias ontogenéticas: el tiempo, la forma y el tamaño. Su análisis tiene sentido cuando tratamos con secuencias de desarrollo causales y conservadas, en las que no se producen inserciones de eventos en la serie. La conservación de las secuencias ontogenéticas y su transformación esencialmente por las perturbaciones heterocrónicas genera el paralelismo que se observa entre ontogenia y filogenia.

El concepto de heterocronía, tanto en su aspecto teórico como en su práctica metodológica, no está exento de ciertas controversias. En la actualidad se utilizan varios conceptos de heterocronía hasta cierto punto discrepantes, quizás por proceder de campos de estudio diferentes (KLINGENBERG, 1998). En su acepción más clásica, establecida en

la tradición haeckeliana y más propia de los biólogos evolutivos, se hace más incidencia, como hemos visto, en la causalidad de las series ontogénicas, su conservación y las modificaciones de su porción terminal (ALBERCH, 1985; ALBERCH & BLANCO, 1996; MCKINNEY & MCNAMARA, 1991). Por su parte, el renovado interés por los estudios evolutivos por parte de los biólogos del desarrollo -cuya investigación se centra más en el análisis espacial y temporal de la expresión de los genes implicados en la ontogenia o de los mecanismos de diferenciación celular o tisular- ha desvirtuado, según algunos autores el concepto de heterocronía (ALBERCH & BLANCO, 1996; MCKINNEY & MCNAMARA, 1991). Básicamente, se entiende que la evolución morfológica es el resultado de la disociación de una serie ontogénica (HALL, 1992; RAFF & WRAY, 1989). Dentro de todos los tipos de disociaciones posibles, las heterocronías serían las más abundantes e importantes; implican cualquier alteración en la secuencia ontogénica en el orden de los elementos, desde los más tempranos hasta los más tardíos (COLLAZO, 1996; RICHARDSON, 1995; WRAY & MCCLAY, 1989). No se considera, por tanto, que la causalidad o la conservación sean características necesarias para que una serie ontogénica sea estudiada con un análisis de heterocronías.

Una referencia especial merecen los últimos estudios en genética molecular del desarrollo, que analizan los patrones ontogénicos desde una perspectiva distinta. Tanto las unidades homólogas que se pueden comparar entre ontogenias como los tipos de procesos y patrones generados cambian y se trabaja en un nivel de complejidad diferente (ABOUHEIF, 1997; MINDELL & MEYER, 2001), por lo que a veces es complicado aplicar los mismos conceptos y la misma metodología. Aún así, los nuevos avances en este campo aportan una información valiosísima que debe ser necesariamente integrada (DUBOULE, 1994).

En cualquiera de los casos, la terminología que más se emplea en la actualidad (ALBERCH *et al.*, 1979; MCKINNEY & MCNAMARA, 1991; ROSAS, 1989) distingue entre ocho procesos heterocrónicos (gigantismo proporcionado, enanismo proporcionado, progénesis, neotenia, post-desplazamiento, hipermorfosis, aceleración y pre-desplazamiento) que pueden generar dos patrones morfológicos heterocrónicos diferentes (peramorfosis y paedomorfosis). Los procesos implican cambios temporales relativos al inicio o final, o cambios en las tasas de crecimiento, bien en las tasa de desarrollo del tamaño o de la forma, de los eventos dentro de una serie ontogénica:

1- Progénesis: terminación anticipada del desarrollo.
2- Neotenia: ralentizamiento de las tasas de desarrollo de la forma.
3- Post-desplazamiento: retraso en el inicio del desarrollo.
4- Hipermorfosis: retraso en el final del desarrollo.
5- Aceleración: se aceleran las tasas de desarrollo de la forma.
6- Pre-desplazamiento: se adelanta el inicio del desarrollo.
7- Gigantismo proporcionado: se incrementan las tasas de desarrollo del tamaño.
8- Enanismo proporcionado: se ralentizan las tasas de desarrollo del tamaño.

Los tres primeros procesos generan un patrón morfológico paedomórfico que se asemeja a una forma ancestral embrionaria o juvenil como consecuencia de la termina-

ción temprana de la ontogenia, mientras que los tres siguientes generan un patrón peramórfico, esto es, una nueva morfología adulta obtenida por la adición terminal de estadios a la secuencia ancestral. Los dos últimos procesos (gigantismo y enanismo) implican un cambio en el tamaño final, pero no en la forma, de los individuos.

Con esta terminología y este tipo de análisis, se encauza el estudio de la relación entre ontogenia y filogenia. El objetivo es la búsqueda de patrones globales en la organización estructural de la ontogenia; es una metodología que lleva a predecir las regularidades en las transformaciones y expresión de morfologías específicas (Alberch & Blanco, 1996).

Heterocronías y anfibios

Abundan los ejemplos en la bibliografía en los que se asocia heterocronías en diferentes grupos animales a determinadas tendencias macroevolutivas (McKinney & McNamara, 1991), a la aparición de novedades evolutivas en un grupo (Wake & Roth, 1989), a su diversificación morfológica (Irish, 1989), o a cambios morfológicos más concretos como procesos de osificación (p. ej., la osificación craneal en poecílidos, Strauss, 1990). Uno de los aspectos más estudiados ha sido la relación entre las heterocronías y variaciones en las estrategias vitales ("life-history traits") de los organismos. Estos cambios incluyen, por ejemplo, los cambios en estructuras reproductoras o en modos de reproducción. Ejemplos clásicos son, por ejemplo, los cambios ontogénicos que conducen a la aparición de diferentes tipos de larvas en equinodermos (Wray & Raff, 1991).

Los procesos heterocrónicos, sin embargo, han sido especialmente importantes en la evolución de los anfibios. Desde el propio origen de los anfibios modernos (Lissamphibia) considerado como un patrón paedomórfico (Bolt, 1969; 1979) hasta uno de los ejemplos más mencionados, las larvas neoténicas de *Ambystoma* que son maduras sexualmente (Gould, 1977), los procesos heterocrónicos aparecen recurrentemente en referencia a la evolución de los distintos grupos de anfibios (Hanken, 1999). Hay ejemplos en todos los ámbitos de estudio: análisis del desarrollo embrionario (*Ambystoma* [Collazo, 1994] o *Taricha* [Northcutt *et al*., 1994]), de las estrategias vitales en cecilias (Exbrayat y Hraouit-Bloquet, 1994) o en anuros (Emerson, 1996) y de estructuras más concretas como el desarrollo de las extremidades (*Triturus* [Blanco & Alberch, 1992]).

En todos estos casos, se intenta explicar o relacionar determinadas variaciones o tendencias macroevolutivas con el estudio de la variabilidad de las secuencias ontogénicas entre los individuos de diferentes poblaciones o entre individuos de especies próximas. Esta línea de trabajo nos pareció la más indicada para continuar analizando la diversificación intraespecífica de las estrategias reproductoras en *Salamandra salamandra*.

Una aproximación internalista al viviparismo en Salamandra salamandra

Una de las características más relevantes de la salamandra común en la Península Ibérica, además de la variabilidad de los patrones de coloración y de los caracteres morfológicos como el tamaño de los individuos o la forma de la cabeza, es la aparición de un nuevo modo de reproducción, el viviparismo, en el norte de la Península Ibérica. Este

hecho, la variabilidad poblacional de una característica que por lo general se analiza a una escala supraespecífica (macroevolutiva), convierte a *Salamandra salamandra* en un excelente modelo sobre el que estudiar los mecanismos de aparición de novedades evolutivas. Dada, además, la relación observada entre las variaciones en las secuencias de desarrollo y la aparición de novedades evolutivas en otros taxones, la salamandra común resultaba idónea para emprender estudios evolutivos desde una perspectiva ontogénica, internalista ¿Podría estar la variabilidad fenotípica observada en esta especie, especialmente en lo que refiere a estrategias reproductoras, relacionada con cambios ocurridos durante la ontogenia?

Se sabe (Dopazo & Alberch, 1994; Greven, 1998; Joly, 1968) que la estrategia vivípara se caracteriza, entre otros aspectos, por la eclosión temprana de los embriones dentro de los úteros maternos, por los fenómenos de adelfofagia (ingesta intrauterina de huevos y embriones) y por una cierta aceleración en el desarrollo intrauterino de las larvas, interpretada por Dopazo (1995) y Dopazo & Korenblum (2000) como una heterocronía. Sin embargo, estos autores, al analizar tanto las secuencias de osificación del cráneo como la remodelación del aparato hiobranquial y de los huesos del paladar durante la metamorfosis en larvas de diferentes poblaciones ovovivíparas y vivíparas de la península, encuentran que prácticamente todas las larvas (99,1%) presentan una misma secuencia de desarrollo craneal: no hay ninguna alteración o variación ontogénica a este nivel.

Con estos antecedentes, se planteó como el objetivo central de este capítulo la caracterización y comparación de las secuencias ontogénicas de individuos ovovivíparos y vivíparos desde la fertilización hasta la metamorfosis para comprobar las posibles diferencias entre ambas. Si estas diferencias realmente existen, se analizará cuándo y cómo ocurren, y si pueden ser consideradas como procesos heterocrónicos. El propósito final es establecer la posible relación causal entre las variaciones ontogénicas entre poblaciones y la aparición del viviparismo en *Salamandra salamandra.*

Además, analizaremos en detalle el desarrollo de dos componentes que pueden ser muy relevantes en el contexto del viviparismo: la dentición, por la diferencia en el tiempo de inicio de la alimentación activa en larvas vivíparas y ovovivíparas y los balancines, ya que la aparición de estos órganos, como veremos más adelante, también guarda relación con el inicio de la alimentación activa de las larvas.

Dentición y balancines

La dentición de las larvas de *Salamandra salamandra*, como ocurre en otros anfibios, difiere de la de los adultos tanto en la forma de los dientes como en su distribución (Clemen & Greven, 1974; Clemen & Greven, 1994; Parker & Dunn, 1964; Wake, 1976). Los dientes de las larvas son monocúspides y se presentan en varias hileras ("polystichous") mientras que los dientes de las salamandras adultas son bicúspides y aparecen en una única hilera ("monostichous"). Durante el desarrollo larvario, la única variación en los dientes que ha sido descrita es la aparición en las larvas próximas a la metamorfosis de una constricción secundaria en la zona media del diente, la llamada "zona de división".

Dado que los patrones de dentición descritos en la bibliografía han sido analizados a partir de larvas ovovivíparas y dadas las peculiaridades de la estrategia de

desarrollo vivípara en la que se producen fenómenos de oofagia y adelfofagia intrauterinos (Dopazo & Alberch, 1994; Joly, 1968), nos planteamos analizar el desarrollo de la dentición en las larvas y embriones de salamandras ovovivíparas y vivíparas para comprobar si existían diferencias entre ambos grupos en los procesos de aparición y transformación de la dentición.

Los balancines, por su parte, son unos órganos situados a ambos lados de la cabeza, entre los ojos y los apéndices branquiales. Tienen forma de bastón, terminando en un pequeño bulbo pegajoso. Aparecen sólo en un número limitado de especies de urodelos, normalmente en los estadios embrionarios tardíos y, por lo general, antes del total desarrollo de los miembros anteriores, desapareciendo siempre antes de la metamorfosis (Crawford & Wake, 1998). Los balancines son propios de las especies cuyo desarrollo transcurre en aguas tranquilas y son considerados una novedad morfológica en Caudata (aunque Bolzern *et al.*, 2000 analizan la homología entre los balancines y los órganos adhesivos en Anura). A pesar de estas peculiaridades, estos órganos no han sido estudiados en profundidad ni desde un punto de vista sistemático, ni desde un punto de vista ontogénico. Tampoco se conoce cuál o cuáles son sus funciones, si bien se postula que pueden utilizarse como estabilizadores de la larva antes de que desarrolle sus miembros anteriores, como órganos de adhesión gracias a la viscosidad de su bulbo terminal o como órganos mecano- o quimiorreceptores.

Aunque se suele considerar que los balancines aparecen en las especies cuyas larvas no presentan unos miembros anteriores funcionales en el momento de la eclosión, sería más preciso decir que aparecen en las especies cuyas larvas comienzan a comer antes del desarrollo completo de sus miembros anteriores (Crawford & Wake, 1998). Algunas especies tienen los miembros anteriores poco desarrollados en el momento de la eclosión, aunque mantienen unas reservas de vitelo que aseguran su alimentación. En estas especies, los balancines no aparecen o se desarrollan como órganos rudimentarios. Esto sugiere que la presencia de los balancines está más relacionada con el estadio de desarrollo de los miembros anteriores en el momento en el que los embriones empiezan a alimentarse activamente más que con el momento de la eclosión.

En lo que se refiere a las especies de Salamandridae incluida en este trabajo (géneros *Chioglossa*, *Mertensiella* y *Salamandra*), la presencia de balancines sólo ha sido analizado en cinco especies: *Ch. lusitanica*, *M. caucasica* y *S. luschani* no presentan estos órganos, mientras que en *S. atra* y *S. salamandra* aparecen unos balancines rudimentarios (Wunderer, 1910). Nada se sabe del resto de especies que conforman este clado de Salamandridae.

Dada la escasa información sobre el desarrollo de estos órganos, la ausencia de información sobre la posible variabilidad intraespecífica que puede llegar a tener y, sobre todo, la relación entre la presencia de balancines y el momento en el que los embriones empiezan a alimentarse activamente, nos pareció interesante comparar el desarrollo de estos órganos en los embriones de salamandras ovovivíparas y vivíparas.

2. Material y Métodos

Para caracterizar las secuencias ontogénicas en ambas estrategias reproductoras, capturamos ocho hembras de la población vivípara de Oviedo (Asturias), así como nueve de la población ovovivípara de Mijares (Ávila), para realizar el seguimiento *in vitro* del desarrollo de los embriones y de las larvas. Además, incluimos en el análisis otras tres hembras de Oviedo y dos de Mijares provenientes de la colección herpetológica del MNCN (hembras grávidas con sus huevos, embriones o larvas). La lista completa de ejemplares estudiados, así como sus fechas de sacrificio y el estado en que se encontraban pueden consultarse en la Tabla 1.

Las hembras de *Salamandra salamandra*, después del apareamiento, almacenan los espermatozoides en su espermateca hasta la ovulación, que puede producirse incluso meses después (Joly, 1968). La fertilización de los huevos se produce en ese momento, cuando los huevos pasan del ovario al oviducto-útero (Greven, 1998; Greven & Guex, 1994). Para hacer el seguimiento del desarrollo de los embriones desde la fertilización, nos interesaba capturar las hembras antes de que ovularan. Determinamos el momento idóneo de muestreo en cada localidad a partir de los datos obtenidos en prospecciones anteriores y de referencias bibliográficas (Barbadillo *et al*., 1999; Joly, 1968). Los muestreos en Oviedo se llevaron a cabo en mayo y junio de 1997, 1999 y 2001 y en Mijares entre marzo y abril de 1997, 1999 y 2001. Una vez en el MNCN, las hembras se mantuvieron en terrarios cubiertos de musgo siempre húmedo, a una temperatura de entre 14ºC y 17ºC, con un ciclo de luz-oscuridad de 12h y alimentándolas dos veces por semana. Cuando las hembras de sala-

Tabla 1: Relación de las hembras analizadas de la población vivípara de Oviedo y ovovivípara de Mijares. **H**: Huevos; **E**: Embriones; **L**: Larvas. Hemos indicado con un asterisco los ejemplares provenientes de la colección herpetológica del MNCN.

EJEMPLAR	SACRIFICIO	ÚTERO DERECH.	ÚTERO IZQ.
Oviedo-1*	11/7/95	4 E + 20 H	8 E + 30 H
Oviedo-2*	21/9/95	3 L	3L
Oviedo-3*	14/5/97	10 L	13 L
Oviedo-4	18/7/97	8 E + 33 H	3 E + 41 H
Oviedo-5	18/7/97	4 E + 16 H	3 E + 27 H
Oviedo-6	31/7/97	6 L + 30 H	9 L + 31 H
Oviedo-7	18/7/97	12 L	10 L + 1 H
Oviedo-8	31/7/97	Sin Ovulación	Sin Ovulación
Oviedo-9	19/8/97	35 H	3 L
Oviedo-10	15/6/99	53 H	50 H
Oviedo-11	14/7/99	4 L	4 L
Mijares-1*	12/1/96	27 L	21 L + 1 H
Mijares-2*	12/1/96	25 L	28 L
Mijares-3	12/11/97	13 L	21 L + 1 H
Mijares-4	6/5/99	Sin Ovulación	Sin Ovulación
Mijares-5	24/6/99	Sin Ovulación	Sin Ovulación
Mijares-6	12/7/01	16 H	26 H
Mijares-7	13/7/01	25 H	32 H
Mijares-8	18/7/01	31 H	29 H
Mijares-9	18/7/01	22 E	19 E
Mijares-10	31/7/01	24 E + 1 H	23 E + 1 H
Mijares-11	Parto de 29 larvas el 12/12/01		

mandra ovulan sufren un ligero cambio en la forma del cuerpo. Cada día verificamos el estado en el que se encontraban las hembras capturadas, y cuando existían indicios claros de la ovulación, procedíamos a su disección previa anestesia con un gel de benzocaína (Topicaína Organon, Organon Teknika Española, S. A.). Los huevos y embriones de cada oviducto fueron colocados en un contenedor de plástico (8 cm de diámetro por 4 cm de alto) en una solución salina isotónica (Medio Holtfreter al 10%, ARMSTRONG *et al.*, 1989). Los contenedores fueron colocados en una incubadora a una temperatura constante de 17 ºC y en la oscuridad. Tomamos fotografías de los embriones regularmente con una cámara Nikon FX-35WA acoplada a una lupa binocular Nikon SMZ-10 para documentar las series ontogénicas. También fijamos regularmente en formol al 10% algunos individuos en diferentes estadios de desarrollo para su posterior análisis. Para analizar el desarrollo del aparato masticador embrionario-larvario, aislamos las mandíbulas superior e inferior de veinte individuos en diferentes estadios de desarrollo, las limpiamos de restos de tejido en una solución de cloruro potásico (KCl) y las estudiamos con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), siguiendo dos procedimientos distintos. Para la primera serie de individuos, fijamos las mandíbulas en una solución de glutaraldehído, tampón fosfato (pH 7,2) y agua destilada (20 ml de agua, 1ml de glutaraldehído al 25% y 15 de tampón fosfato) durante 2 horas a temperatura ambiente o durante 24 horas a 4ºC. Después de la fijación las muestras se lavaron bien con agua destilada para proceder posteriormente a su deshidratación en una serie de etanol al 10%, 30%, 50%, 70% y 100%. Mantuvimos los tejidos 30' en cada dilución de etanol, pasándolos luego a acetona al 100%. Finalmente se procedió a realizar el llamado "punto crítico" de las muestras con un "Bio-Pad 3000 unit", su posterior metalizado y análisis en un microscopio E. B. PHILLIPS. Para la segunda serie de individuos, las mandíbulas aisladas y limpias de tejido fueron directamente analizadas en un microscopio electrónico ambiental de barrido modelo Quanta 200.

Otro aspecto de la morfología de los embriones que nos interesaba analizar era la relación entre el tamaño corporal y el de la masa vitelina del huevo. COLLAZO & MARKS (1994) muestran la relevancia de ese parámetro en otra familia de salamandras (Plethodontidae), proponiendo un método para cuantificar el volumen relativo que ocupa el embrión considerando la masa total del huevo. Aunque se trata de un análisis un tanto intuitivo y aproximado, este parámetro nos da una idea del tamaño relativo del embrión con respecto a su reserva vitelina. Se cuantifica dividiendo la distancia interocular (a) de un embrión por la amplitud máxima de la masa vitelina (b) medida perpendicularmente al eje antero-posterior embrionario (Fig. 1). Si el cociente (a)/(b) es superior a 0,5 se considera que el embrión ocupa una proporción alta del volumen

Fig. 1: Relación entre el tamaño del embrión y su masa vitelina. **a**: distancia interocular; **b**: amplitud máxima de la masa vitelina. Tomado de COLLAZO & MARKS (1994).

total del huevo mientras que si es inferior a 0,5 implica que es la masa vitelina la que ocupa la mayor parte del huevo.

Para analizar las series ontogénicas, nos hemos apoyado en tres tablas de desarrollo distintas: (i) de *Ambystoma maculatum* (Harrison, 1969), al ser considerada la tabla de referencia para urodelos, (ii) de *Salamandra salamandra* (Gasche, 1939), una tabla parcial de desarrollo en la que el autor divide su secuencia ontogénica en seis únicos estadios diferenciables y (iii) de *Salamandra atra* (Wunderer, 1910), por ser una especie emparentada y con desarrollo vivíparo. De aquí en adelante y por simplificar, nos referiremos a ellas como H69, G39 y W10, respectivamente.

Un problema con el que nos hemos encontrado a la hora de describir los ejemplares, ha sido la elección de una terminología correcta que defina las diferentes etapas del desarrollo. Por lo general el desarrollo completo de los anfibios puede subdividirse en tres fases distintas: la etapa embrionaria (individuos dentro de las membranas del huevo en el útero materno y alimentación por medio del vitelo, exclusivamente), la etapa larvaria (fase de vida libre, fuera de las envolturas del huevo y con alimentación activa) y la etapa terrestre en la que transcurre la vida adulta de los individuos. El paso de la primera a la segunda etapa implica normalmente la puesta y el de la segunda a la tercera la metamorfosis. En las salamandras vivíparas, sin embargo, el desarrollo completo desde la fertilización hasta la metamorfosis es intrauterino. Las dos etapas, embrionaria y larvaria, se suceden en el útero sin que haya puesta, por lo que es difícil delimitar la transición embrión-larva. En este trabajo consideraremos que la eclosión marca la transición de embrión a larva, ocurra ésta en el momento de la puesta (en las salamandras ovovivíparas) o dentro de los úteros maternos (en las vivíparas).

3. Resultados

A continuación, pasaremos a describir las secuencias de desarrollo de individuos ovovivíparos y vivíparos. En primer lugar, describiremos con detalle en forma de tabla de estadios de desarrollo la secuencia ontogénica de las salamandras ovovivíparas. Esta tabla de desarrollo nos servirá de referencia para localizar las posibles diferencias temporales o estructurales que puedan producirse durante el desarrollo de los individuos vivíparos.

Desarrollo ovovivíparo

El número de huevos presentes en los úteros de las hembras ovovivíparas analizadas varió entre 31 y 60 (media: 43, Tabla 1 con los datos exactos). El número de larvas liberadas por hembra varía normalmente entre 20 y 60 (Barbadillo *et al.*, 1999).

Hemos dividido la secuencia de desarrollo en 21 estadios fácilmente distinguibles por sus características morfológicas externas. Hemos indicado, al final de la descripción de cada estadio, el tiempo aproximado que tardaron los embriones en alcanzar ese estadio a partir del inicio de nuestra serie.

Estadio I: La primera fase identificable en nuestros embriones es la gastrulación. Las primeras divisiones celulares después de la fecundación hasta la fase de blástula suelen ser bastante rápidas (entre uno y dos días en *Ambystoma maculatum* [Harrison, 1969] o en *Triturus boscai*, por ejemplo [Barbadillo, 1989]), por lo que no pudimos observarlas en nuestros ejemplares. El primer signo de la gastrulación es la aparición del labio del blastoporo en forma de muesca (primera gástrula), labio que poco a poco se va curvando hasta cerrarse, adquiriendo el blastoporo una forma circular (gástrula media), que poco a poco va obliterándose y quedando al final como una pequeña hendidura (última gástrula). En ese lugar se desarrollará posteriormente el ano. En la Fig. 2, observamos el estadio de última gástrula, con la hendidura blastoporal obliterada. Este estadio se correspondería con el estadio 12 de H69, el 1 de G39 y el 2 de W10.

Estadio II: Poco después de la aparición de la hendidura del blastoporo se inicia la neurulación con la aparición de una placa neural engrosada, con una zona cefálica (A) y otra neural (B) diferenciada (Fig.3). En este estadio se aprecian los bordes de la placa (repliegues neurales) aún bastante separados (estadios 15-16 de H69 y 3 de W10) (entre 12h y 20h).

Estadio III: Los bordes de la placa van engrosándose y plegándose, lo que provoca su acercamiento paulatino y la formación del llamado canal neural (Fig. 4) (estadios 17-18 de H69) (24h).

Estadio IV: El canal se va cerrando, dando lugar al surco neural. La zona cefálica aparece cada vez más definida (Fig. 5) (estadio 19 de H69) (36h-40h).

Estadio V: El surco neural acaba cerrándose del todo, dando lugar a lo que será la médula espinal, mientras que la región cefálica de la placa se diferencia en las futuras tres zonas cerebrales: prosencéfalo (P), mesencéfalo (M) y rombencéfalo (R) (Fig. 6) (estadio 20 de H69) (2 días).

Estadio VI: El final de la neurulación da paso al proceso de la organogénesis. En su inicio, la región cefálica se engrosa y se lobuliza, a la vez que se hace cada vez más patente la somitización del embrión (Fig. 7). Éste se alarga sobre la masa de vitelo (estadios 21-23 de H69 y 4 de W10). Este estadio correspondería al estadio de desarrollo conocido como faríngula (3 días).

En este estadio, que es especialmente interesante, se observa una diferencia clara entre los embriones de *S. salamandra* y los de las otras especies de la familia. Los embriones de *S. salamandra* se disponen sobre una masa vitelina muy grande en relación al tamaño del propio embrión mientras que en otras especies como *S. atra* o *Triturus boscai* la masa vitelina es mucho más pequeña y aparece envuelta por el embrión, como también ocurre en especies de otras familias como en el pletodóntido *Euricea bislineata* (Fig. 8). En los embriones de *S. salamandra*, la proporción (a)/(b) (Collazo & Marks, 1994) se sitúa en 0,2 de media.

Estadio VII: La región cefálica comienza a separarse de la masa vitelina, manteniéndose curvada. Comienzan a observarse las vesículas ópticas (O), así como los lóbulos branquiales. También se empieza a diferenciar el llamado rudimento caudal (C) (Figs 9 y 10) (estadios 24-25 de H69) (4 días).

Fig. 2: Estadio I.

Fig. 3: Estadio II.

Fig. 4: Estadio III.

Fig. 5: Estadio IV.

Fig. 6: Estadio V.

Fig. 7: Estadio VI.

Fig. 8: Embrión de *Eurycea bislineata* (fotografía de P. Alberch).

Fig. 9: Estadio VII.

Fig. 10: Estadio VII.

Fig. 11: Estadio VIII.

Fig. 12: Estadio VIII.

Fig. 13: Estadio VIII.

Fig. 14: Estadio IX.

Fig. 15: Estadio IX. Región cefalica.

Fig. 16: Embriones en el estadio IX, apilados en los úteros maternos.

Fig. 17: Estadio X.

Estadio VIII: El cuerpo se alarga poco a poco, a la vez que la separación de la cabeza y del rudimento caudal del vitelo es más patente (Figs. 11 y 12) (estadio 26 de H69 y 5 de W10). En la región cefálica, se aprecian mejor las vesículas ópticas. Los abultamientos branquiales siguen creciendo (B) (Fig. 13) (estadios 27-28 de H69) (6 días).

Estadio IX: A medida que se estira el cuerpo, la cola se va encorvando (Fig. 14). El abultamiento branquial aparece surcado, diferenciándose los abultamientos que darán lugar a los tres pares de branquias (Fig. 15) (estadios 29-30 de H69). Los embriones, como se puede observar en la Fig. 16, siguen envueltos por las membranas del huevo, apilados en los úteros maternos. En este estadio, se observan los primeros movimientos de los embriones (9 días).

Estadio X: Seguidamente el embrión se estira, mientras la cabeza y la cola se separan de la masa vitelina. Se aprecia el desarrollo de la aleta dorsal (C) y la presencia de melanóforos. En la zona en la que se van a desarrollar los miembros anteriores (A) se observa un abultamiento y también se observa un inicio de diferenciación en el tracto digestivo, así como la irrigación del tejido vitelino. Los rudimentos branquiales están bien individualizados (Figs. 17 y 18) (estadios 31-33 de H69 y 5-6 de W10) (13 días).

Estadio XI: En la Fig. 19 mostramos el siguiente estadio de desarrollo en el que se aprecia el principio de la pigmentación de la vesícula óptica, el alargamiento de los tres pares de rudimentos branquiales, el abultamiento cada vez más patente de los miembros anteriores así como una cresta dorsal más ensanchada. También se observa el inicio de los rudimentos de los balancines. Las regiones cefálica y faríngea aparecen más estructuradas y se aprecia un corazón funcional (estadios 34-35 de H69, 2 de G39 y 6 de W10) (14 días).

Estadio XII: En este estadio, observamos el crecimiento de los balancines (B) y de la aleta caudal. Las branquias se han alargado, formando un filamento que presenta un abultamiento terminal. El dorso del embrión está cada vez más pigmentado y la vascularización del vitelo ha aumentado (Fig. 20) (estadio 36 de H69) (16 días).

Estadio XIII: En las Figs. 21 y 22 mostramos una vista ventral y dorsal de un embrión en este estadio de desarrollo. Destaca el crecimiento de los balancines y de las branquias, que empiezan a ramificarse. El abultamiento de los miembros anteriores crece también en forma de cono. Se aprecia con más claridad un corazón funcional (C). En la cabeza se observa un surco bucal aún incipiente (B). La pigmentación ocular, así como la de todo el cuerpo ha aumentado (17 días).

Estadio XIV: Todos los rasgos anteriores se ven con más claridad en este estadio (Figs. 23 y 24), en el que destacamos, además, la diferenciación del sistema digestivo con la formación de la cloaca (C). En este estadio, los balancines alcanzan su máximo desarrollo (estadios 37-40 de H69 y 5-6 de W10) (19 días).

Estadio XV: En las Figs. 25 y 26 observamos cómo se han desarrollado las branquias, que están mucho más ramificadas e irrigadas, el surco bucal aparece abierto pero no en su totalidad, los balancines han desaparecido prácticamente, los miembros anteriores se han alargado considerablemente (aunque aún no se ha empezado a diferenciar la mano) y ya son visibles los rudimentos de los posteriores. Además, las aletas caudales dorsal y ventral están mejor perfiladas. Hay que destacar que el embrión ya ha empezado a

absorber y consumir vitelo, por lo que la masa vitelina se ve más menguada (estadios 41-43 de H69, 3-4 de G39 y 7 de W10) (25 días).

Estadio XVI: En este estadio (Fig. 27), destaca la considerable reducción de la masa vitelina. Los miembros anteriores empiezan a palmearse (A) (Fig. 28) y los posteriores se alargan (P) (Fig. 29). Ya no se distinguen los balancines (estadios 44 de H69) (33 días).

Estadio XVII: El embrión adquiere un aspecto diferente (Fig. 30). La masa vitelina, además de menguada, aparece cada vez más integrada dentro de la cavidad abdominal. Se aprecia una diferenciación de la porción anterior del sistema digestivo. Los miembros posteriores se han alargado considerablemente (Fig. 31) y en los anteriores ya son visibles tres dedos diferenciados (Fig. 30). También se aprecia un cambio en la forma de la cabeza, debido al progresivo desarrollo del aparato mandibular y del aparato hiobranquial. La boca aparece abierta, pero aún no en su totalidad (Fig. 32). Las branquias están bien ramificadas e irrigadas (estadios 45 de H69, 5 de G39) (41 días).

Estadio XVIII: En este estadio el embrión presenta un aspecto más robusto, con una cabeza más ancha y trapezoidal (Fig. 33). Destacan los miembros posteriores, que empiezan a palmearse (Fig. 34) y la completa diferenciación de los cuatro dedos de los miembros anteriores (50 días).

Estadio XIX: En el embrión de la Fig. 35, el surco bucal ya está completamente abierto. Las aletas caudales dorsal y ventral han empezado a reducirse. En los miembros posteriores, ya son visibles cuatro dedos diferenciados (Fig. 36). El sistema digestivo (D) ya ha terminado de formarse y contiene en su interior los últimos restos de vitelo (Fig. 37). Asimismo, se observa la estructura bien definida del aparato hiobranquial (H) (55 días).

Estadio XX: Vemos menguada la cantidad de vitelo dentro del sistema digestivo (Fig. 38), a la vez que se alargan los miembros posteriores mientras empieza a diferenciarse el quinto dedo (Fig. 39) (estadios 46 de H69, 6 de G39) (63 días).

Estadio XXI: En la Fig. 40 el embrión ya ha adquirido una morfología larvaria típica, con todos sus miembros bien formados y funcionales. Ya no se observa restos de vitelo en el digestivo. El nacimiento se produce en este estadio de desarrollo (80-90 días), iniciándose entonces la fase larvaria acuática de vida libre y alimentación activa. La eclosión en las salamandras ovovivíparas se produce simultáneamente con la puesta o muy poco tiempo antes de la misma (Barbadillo *et al.*, 1999; observaciones personales). La fase acuática larvaria tiene una duración variable, determinada por las condiciones ambientales (básicamente por la temperatura y la disponibilidad de alimentos). Las larvas pueden metamorfosearse en unos pocos meses o tardar incluso un par de años (Alcobendas & Castanet, 2000; García-París, 1985 y el capítulo IV de este trabajo). En las condiciones en las que se desarrollaron en el laboratorio, las larvas empezaron a metamorfosearse a mediados de noviembre, unos 120 días después del inicio de la serie. La duración del periodo larvario de vida libre habría sido de un mes y medio, aunque este dato está claramente relacionado con las condiciones de crecimiento en el laboratorio.

El proceso metamórfico en urodelos implica unos cambios estructurales y fisiológicos importantes. Los cambios morfológicos más notables ocurren en la cabeza con la reabsorción de las branquias y la remodelación del aparato hiobranquial. Estos cambios

Fig. 18: Estadio X. Región cefalica.

Fig. 19: Estadio XI.

Fig. 20: Estadio XII.

Fig. 21: Estadio XIII (vista dorsal).

Fig. 22: Estadio XIII (vista ventral).

Fig. 23: Estadio XIV.

Fig. 24: Estadio XIV. Región cefalica.

Fig. 25: Estadio XV.

Fig. 26: Estadio XV. Región cefalica.

Fig. 27: Estadio XVI.

Fig. 28: Estadio XVI. Extremidad anterior.

Fig. 29: Estadio XVI. Extremidad posterior.

Fig. 30: Estadio XVII.

Fig. 31: Estadio XVII. Extremidad posterior.

Fig. 32: Estadio XVII. Región cefalica.

Fig. 33: Estadio XVIII.

Fig. 34: Estadio XVIII. Extremidad posterior.

Fig. 35: Estadio XIX.

Fig. 36: Estadio XIX. Extremidades posteriores.

Fig. 37: Estadio XIX. Vista ventral.

Fig. 38: Estadio XX. Vista ventral.

Fig. 39: Estadio XX. Extremidades posteriores.

Fig. 40: Estadio XXI.

Fig. 41: Larva premetamórfica.

posibilitan el paso de una respiración branquial acuática a la respiración terrestre pulmonar así como el paso a una alimentación con protrusión de la lengua (Özeti & Wake, 1969). En la Fig. 41 observamos unas larvas premetamórficas, con las branquias casi completamente reabsorbidas. Otro cambio característico de las larvas premetamórficas es la progresiva reducción hasta su completa eliminación de las aletas caudales acompañada del engrosamiento de la cola, así como la paulatina adquisición de la coloración adulta.

Desarrollo vivíparo

Según se desprende de nuestros datos, la ovulación y la fecundación en las hembras de Oviedo también se produce a principios de julio. La liberación de los juveniles suele ocurrir entre octubre y enero (Dopazo, 1995; Rivera *et al.*, 1999; Thiesmeier & Haker, 1990; Thiesmeier *et al.*, 1994). En nuestra serie ontogénica los individuos que completaron el desarrollo se metamorfosearon a principios de octubre, lo que coincide con los datos ya publicados. A continuación, vamos a describir las diferencias más significativas en el desarrollo de los embriones de hembras vivíparas con respecto a la secuencia patrón de los embriones ovovivíparos descritos en el apartado anterior. Hemos tomado el grado de desarrollo de las extremidades como punto de referencia y comparación a la hora de asignar un estadio de desarrollo a los embriones vivíparos.

La primera diferencia notable se presenta en el número de huevos por hembra. En las hembras vivíparas varió entre 50 y 103 (media: 75, Tabla 1). La muestra de la que disponemos no permite realizar un análisis estadístico detallado, aunque sí parece que las hembras vivíparas generan un número mayor de huevos que las ovovivíparas (ver también el capítulo IV de este trabajo). Tanto el tamaño (entre 3 y 5 mm de diámetro; ver capítulo IV) como la morfología del huevo son similar en las hembras de ambas estrategias.

La segunda diferencia que queremos destacar es que en las hembras vivíparas no todos los huevos van a desarrollarse, fenómeno que ya se había descrito con anterioridad (Dopazo & Alberch, 1994; Joly, 1968). En una de las hembras disecadas (Ov-9), por ejemplo, los 35 huevos de uno de los úteros no se habían fecundado, mientras que en el otro útero encontramos tres larvas maduras a punto de metamorfosearse. Esto contrasta con el escenario ovovivíparo en el que la práctica totalidad de los huevos (Rivera *et al.*, 1999) se desarrollan con normalidad hasta el momento de la puesta. En las Figs. 42 y 43 mostramos el aspecto de muchos de estros huevos abortivos. En todas las hembras vivíparas que hemos analizado, hemos encontrado huevos con un aspecto similar al de las figuras, mostrando una protrusión de vitelo en uno de sus polos. Un caso extremo fue el de la hembra Ov-10, en la que todos los huevos presentaban este aspecto. Hay que destacar que estos huevos no llegan a desarrollarse en el medio de cultivo. En todas las hembras vivíparas aparecen y, hasta donde hemos visto, no terminan su desarrollo.

Resaltamos la tercera diferencia en la Fig. 44, en la que se muestra un embrión vivíparo en un estadio de desarrollo que se correspondería con el estadio IX del desarrollo ovovivíparo (Fig. 14). El embrión presenta el mismo aspecto, con el mismo grado de diferenciación en la región cefálica. Destaca sin embargo la disposición sobre el vitelo: mientras que en el embrión ovovivíparo tanto la región cefálica como la caudal están

claramente separadas de la masa vitelina, en el embrión vivíparo se mantienen pegadas. A este estadio de desarrollo, los embriones vivíparos llegan aproximadamente a los 3-4 días del inicio de nuestra serie de desarrollo (gastrulación) mientras que los ovovivíparos tardan unos 9 días en alcanzar el mismo estadio.

Al poco tiempo se empieza a separar la cabeza de la masa vitelina (Fig. 45) manteniéndose pegada la región caudal, hasta llegar al siguiente estadio que queremos destacar (Fig. 46). El embrión se ha desarrollado y alargado, sobre todo en su porción anterior. La región caudal sigue pegada a la masa vitelina. En la región cefálica (Figs. 47 y 48) se aprecian las branquias alargadas pero aún no muy ramificadas, el esbozo del surco bucal (S), las vesículas ópticas, los balancines (B) cortos pero desarrollados, además de dos botones celulares que marcan el inicio de desarrollo de los miembros anteriores (A) en la región media del cuerpo. Se puede apreciar movimientos en el embrión. Éste presenta una pigmentación incipiente además de un inicio de diferenciación de la región faríngea y posiblemente del primer tramo del tracto digestivo (D). La masa vitelina se concentra en la región caudal del embrión. Si tomamos como referencia el grado de diferenciación de los miembros anteriores, este estadio de desarrollo se correspondería con el estadio de desarrollo ovovivíparo XII (Fig. 20). Los embriones ovovivíparos en ese momento presentan un aspecto bastante diferente, con la cola bien separada de la masa vitelina y la aleta caudal dorsal ya diferenciada. El embrión se dispone centrado sobre la masa vitelina y no se aprecia una diferenciación clara en su región faríngea o en el primer tramo del sistema digestivo.

Otra diferencia importante es la ruptura de las membranas de los huevos en este estadio de desarrollo. Los embriones vivíparos permanecen dentro de los úteros pero fuera de sus membranas, a diferencia del patrón de desarrollo ovovivíparo en el que, como veíamos anteriormente, la eclosión se produce en el momento de la puesta o un poco antes de ésta. Los embriones vivíparos han tardado entre 8-9 días en romper las membranas mientras que los ovovivíparos han tardado entre 80-90 días.

En la Fig. 49 mostramos otra de las diferencias significativas entre el desarrollo embrionario en hembras vivíparas y ovovivíparas. Mientras que en los úteros de las hembras ovovivíparas los embriones se desarrollan en sincronía, presentando todos (o prácticamente todos) un mismo estadio de desarrollo (ver como ejemplo, la Fig. 16), en las hembras vivíparas los embriones pueden encontrarse en estadios muy diferentes. Como vemos en la figura, en un mismo útero podemos encontrar huevos sin fecundar (o abortados), embriones eclosionados y en un estadio de desarrollo inicial, embriones sin eclosionar o embriones que han iniciado su alimentación activa (oofagia).

La siguiente diferencia que queremos destacar está representada en la Fig. 50. Tomando de nuevo como referencia el desarrollo de los miembros anteriores y posteriores, este estadio de desarrollo se correspondería con el XIV ovovivíparo (Figs. 23 y 24). En relación con el desarrollo cefálico, el embrión vivíparo presenta una cabeza más desarrollada, menos redondeada y con el inicio de apertura del surco bucal, cabeza que se correspondería más con un embrión ovovivíparo en estadio XV (Fig. 26). Los balancines, en el embrión vivíparo ya han sido reabsorbidos, mientras que en el ovovivíparo no. La

Fig. 42: Huevos provenientes de una hembra vivípara de Oviedo.

Fig. 43: Huevo proveniente de una hembra vivípara de Oviedo.

Fig. 44: Embrión vivíparo en el estadio IX.

Fig. 45: Embrión vivíparo en el estadio IX. Región cefalica.

Fig. 46: Embrión vivíparo en el estadio XII.

Fig. 47: Embrión vivíparo en el estadio XII. Vista ventral.

Fig. 48: Embrión vivíparo en el estadio XII. Región cefalica.

Fig. 49: Variabilidad en los estadios de desarrollo en un mismo útero de una hembra vivípara. Asincronía en el desarrollo vivíparo.

masa vitelina se ve bastante reducida y además se aprecia con claridad la diferenciación del primer tramo del sistema digestivo (D), formándose una primera cavidad que se comunica con el grueso de la masa vitelina por un pliegue, que no se aprecia en los embriones ovovivíparos. Las membranas caudales, por último, están menos desarrolladas. Los embriones vivíparos alcanzan este estadio a los 12-13 días de cultivo, mientras que los ovovivíparos necesitan unos 19 días.

En este estadio, los embriones vivíparos son capaces de alimentarse activamente (fenómenos de oofagia y adelfofagia), como se ve reflejado en la Fig. 51, a pesar de que su surco bucal aún no se encuentra abierto en su totalidad. En las Figs. 52 y 53 vemos un embrión en un estadio de desarrollo un poco más avanzado (con los miembros anteriores empezando a palmearse y se distingue el rudimento cónico de los posteriores) ingiriendo un huevo. Como se puede apreciar, el vitelo ingerido va a parar a la primera bolsa diferenciada del sistema digestivo que describíamos anteriormente. Si nos atenemos de nuevo al grado de diferenciación de las extremidades, el estadio de este embrión se correspondería con una estadio XVI ovovivíparo (Fig. 27). Contrasta la diferente cantidad de vitelo entre ambos. Al estadio XVI los embriones ovovivíparos han tardado en llegar 33 días mientras que los vivíparos han tardado unos 18-20 días.

En las Figs. 54 y 55 se muestra una larva en un estadio de desarrollo más avanzado (miembros anteriores perfectamente formados y posteriores con los dedos sin diferenciar, presentando una estructura palmeada) ingiriendo otra larva (fenómeno de canibalismo). Como se puede apreciar, la cola de la larva ingerida pasa directamente a la primera porción del sistema digestivo. Este embrión vivíparo se podría situar entre los estadios XVIII y XIX ovovivíparos, pero habiendo tardado unos 30 días en alcanzarlo en vez de entre 50 y 55 días como los embriones ovovivíparos.

Como resultado de la ingesta de huevos y de otros embriones dentro de los úteros maternos, los individuos vivíparos alcanzan una morfología larvaria manteniendo una gran cantidad de vitelo en su digestivo, después de haber consumido su reserva vitelina inicial. Por su parte, los embriones ovovivíparos consumen la masa vitelina para alcanzar la morfología larvaria antes de la puesta, naciendo con el digestivo sin rastro de vitelo. Cuando se produce la eclosión y la puesta de las larvas ovovivíparas, las larvas vivíparas están a punto de metamorfosearse dentro de los úteros maternos, antes del parto. Las larvas vivíparas consumen su reserva vitelina inicial más rápidamente y necesitan un aporte extra de alimento para seguir su desarrollo. Gracias al vitelo suplementario procedente de la ingesta de huevos, consiguen completar el desarrollo hasta la metamorfosis en menos tiempo que las larvas ovovivíparas. El resultado final del desarrollo vivíparo es la puesta de juveniles terrestres perfectamente formados y que presenta la coloración típica de *S. s. bernardezi*. En la Fig. 56 mostramos tres de los juveniles que se metamorfosearon en el laboratorio tras su desarrollo *in vitro*. La metamorfosis se produjo entre la última semana de septiembre y la primera de octubre (unos 90 días desde la fecundación). Uno provenía de una hembra disecada a primeros de julio mientras que los otros dos de otra hembra disecada a finales de agosto. Los juveniles presentaron un aspecto y un tamaño muy similar, que además se corresponde con los tamaños descritos en la

Fig. 50: Embrión vivíparo en el estadio XIV.

Fig. 51: Alimentación activa (oofagia) en los embriones vivíparos en el estadio XV-XVI.

Fig. 52: Alimentación activa (oofagia) en los embriones vivíparos en el estadio XV-XVI.

Fig. 53: Alimentación activa (oofagia) en los embriones vivíparos en el estadio XV-XVI.

Fig. 54: Fenómenos de canibalismo entre individuos provenientes de un mismo útero materno.

Fig. 55: Fenómenos de canibalismo entre individuos provenientes de un mismo útero materno.

Fig. 56: Juveniles vivíparos recíen metamorfoseados.

bibliografía para juveniles de *Salamandra salamandra bernardezi* (Rivera *et al*., 1999; Thiesmeier *et al*., 1994).

Dentición y balancines

En la Fig. 57, modificada de Clemen (1984), hemos representado la dentición típica de una larva de *Salamandra salamandra* (salamandras ovovivíparas). Como se puede observar, las larvas presentan en la mandíbula inferior dos zonas de dentición características: una hilera de dientes a lo largo del arco bucal (dientes mandibulares inferiores, dentarios y premaxilares), además de dos campos dentales espleniales laterales. En la mandíbula superior, también se aprecia una hilera de dientes a lo largo del arco bucal (dientes mandibulares superiores, dentarios y premaxilares). Además, presentan dos campos dentales cercanos a cada coana: un campo dental pterigopalatino y

Fig. 57: Esquema de la denticíon de las larvas de *S. salamandra*, según CLEMEN (1984); **A**: campo dental vomeriano; **B**: campo dental pterigopalatino; **C**: dientes mandibulares superiores; **D**: coanas; **E**: dientes mandibulares inferiores; **F**: campo dental esplenial; **G**: lengua.

otro campo dental vomeriano. La dentición cambia en la metamorfosis para dar lugar a la dentición final del adulto: los dentarios, premaxilares y vomerianos se disponen en una única fila ("monostichous") (durante la fase larvaria aparecen en varias -"polystichous"), mientras que desaparecen los campos espleniales y pterigopalatinos. Además, los dientes pasan de ser monocúspides a bicúspides (Clemen & Greven, 1974; Clemen & Greven, 1994; Parker & Dunn, 1964).

Para caracterizar los patrones de dentición de los embriones ovovivíparos y vivíparos y las posibles diferencias entre ambas estrategias, hemos analizado las bocas de embriones en cuatro estadios de desarrollo distintos: en los embriones ovovivíparos cuando (i) el surco bucal aparece por primera vez abierto y manteniéndose apilados en los úteros maternos y dentro de sus membranas (estadio XV), (ii) antes de la puesta (estadio XXI), (iii) en larvas premetamórficas y (iv) en los juveniles terrestres recientemente metamorfoseados; en los embriones vivíparos, cuando (i) el surco bucal aparece abierto y los embriones empiezan su alimentación activa (estadio XIV-XV), (ii) los embriones han consumido la práctica totalidad de su masa vitelina (estadio XX-XXI), (iii) en las larvas premetamórficas intrauterinas y (iv) en los juveniles terrestres recién metamorfoseados.

En la Fig. 58 mostramos la dentición de la mandíbula superior de un embrión de Mijares (estadio XV). Como se puede apreciar, los dientes aún no han aparecido ni en lo campos dentales vomerianos (A) cercanos a las coanas (C) ni en los mandibulares superiores (B). En la Fig. 59, mostramos un detalle del campo dental mandibular: se aprecia un claro abultamiento, aunque los dientes aún no han despuntado. En la Fig. 60, mostramos una zona del campo dental mandibular de un embrión de una hembra vivípara de Oviedo. Basándonos de nuevo en el grado de desarrollo de las extremidades, el embrión se encontraría en un estadio de desarrollo XIV, aunque el grado de diferenciación de su región cefálica corresponde al de un embrión en el estadio XV, similar al embrión ovovivíparo anterior. En este estadio, como mencionábamos anteriormente, los embriones vivíparos inician su alimentación activa a pesar de no tener el surco bucal abierto en su totalidad. Como se puede apreciar en las figuras, el crecimiento de los dientes en los embriones ovovivíparos y vivíparos es muy similar.

En las Figs. 61 y 62 mostramos las mandíbulas superior e inferior respectivamente de un embrión de Mijares en el estadio de desarrollo (XXI), estadio en el que se produciría su liberación, iniciándose la etapa larvaria. Como se puede apreciar en una ampliación (Fig. 63), los dientes son muy aparentes, aunque aún siguen recubiertos de tejido. El patrón de desarrollo de la dentición en los embriones vivíparos en este mismo estadio es muy similar.

En la etapa de vida acuática libre, los dientes empiezan a aparecer con claridad en las larvas (Fig. 64), lo que también ocurre en los embriones vivíparos en el mismo estadio de desarrollo (Fig. 65), aunque éstos últimos se mantengan dentro de los úteros maternos. Antes de la metamorfosis, las larvas ovovivíparas y vivíparas han desarrollado considerablemente su dentición, como se puede apreciar en la Fig. 66.

Después de la metamorfosis, en los juveniles tanto ovovivíparos como vivíparos se empieza a desarrollar la dentición que ya será definitiva durante su vida adulta. Como

Fig. 58: Mandíbula superior de un individuo ovovivíparo de Mijares en el estadio de desarrollo XVII-XVIII.

Fig. 59: Detalle de la dentición del individuo de Mijares en el estadio XVII-XVIII.

Fig. 60: Detalle de la dentición de un individuo vivíparo de Oviedo en el mismo estadio de desarrollo.

Fig. 61: Mandíbula superior de un individuo ovovivíparo de Mijares en el estadio de desarrollo XXI.

Fig. 62: Mandíbula inferior de un individuo ovovivíparo de Mijares en el estadio de desarrollo XXI.

Fig. 63: Detalle de la dentición del individuo de Mijares en el estadio XXI.

se puede apreciar en la Fig. 67, en la mandíbula superior de un juvenil desaparecen los campos dentales pterigopalatinos, quedando sólo los campos dentales mandibulares (M) y los vomerianos (V), que se alargan sobre el paladar en una única fila de dientes. En los individuos recientemente metamorfoseados, es posible observar todavía dientes larvarios (Fig. 68), así como dientes bicúspides propios de la dentición adulta (Fig. 69).

Fig. 64: Diente de una larva de Mijares, después de la eclosión.

Fig. 65: Diente de un individuo de Oviedo en el mismo estadio de desarrollo.

Fig. 66: Detalle de la mandíbula superior de un individuo premetamórfico de Oviedo.

Fig. 67: Dentición de un juvenil ovovivíparo. Mandíbula superior.

Fig. 68: Diente larvario en juvenil recién metamorfoseado.

Fig. 69: Diente bicúspide característico de los juveniles y adultos de *S. salamandra*.

El proceso de desarrollo de la dentición en los embriones y larvas ovovivíparos y vivíparos es, como hemos visto, muy similar. No se aprecian diferencias claras en el momento de la aparición de los dientes, a pesar de la clara diferencia que existe entre ambas estrategias en el inicio de la alimentación activa.

En lo que se refiere a los balancines, tampoco se aprecia una diferencia clara entre las dos estrategias estudiadas ni en el momento de su aparición, ni en su forma o desarrollo, pero sí en el momento de su desaparición. Los balancines en los embriones ovovivíparos aparecen en el estadio de desarrollo XI (Fig. 19). Alcanzan su máximo desarrollo en el estadio XIV (Fig. 23 y 24) y desaparecen en le estadio XVI (Fig. 27). Aparecen cuando los miembros anteriores son sólo una diferenciación celular inicial. Cuando desaparecen, los miembros anteriores forman un rudimento cónico alargado, mientras que los posteriores empiezan a diferenciarse. En estos estadios, el surco bucal empieza a abrirse y la cabeza en general ha sufrido una fuerte remodelación. En los embriones vivíparos estas remodelaciones ocurren antes, por lo que los balancines también desaparecen un poco antes. En cualquier caso, el crecimiento y desarrollo de los balancines en *Salamandra salamandra* está bastante reducido, pudiendo ser considerados como órganos rudimentarios atávicos (Crawford & Wake, 1988; Wunderer, 1910).

4. Discusión

Secuencia de desarrollo en Salamandra salamandra

Existen en la bibliografía numerosas tablas de desarrollo para muchas especies de anfibios (Duellman & Trueb, 1986). No todas comparten los mismos criterios a la hora de establecer los estadios de desarrollo, por lo que pierden cierto poder comparativo. Los diferentes estadios suelen establecerse a partir de rasgos característicos de la morfología externa de los individuos. Parámetros como el peso o la longitud de los embriones o alguna característica fisiológica, aunque mencionados, suelen excluirse como caracteres diagnósticos por su variabilidad potencial. Gasche (1939) describe el desarrollo de *Salamandra salamandra* en ejemplares provenientes de Alemania, dividiendo la secuencia ontogénica desde la aparición del rudimento caudal hasta la metamorfosis en seis estadios fácilmente distinguibles. En este capítulo, hemos analizado más en detalle el desarrollo de embriones del centro de la Península Ibérica. A pesar de las diferentes escalas de análisis, hay que mencionar la similitud de la secuencia de desarrollo descrita por Gasche y los datos obtenidos en nuestro trabajo, considerando las diferencias taxonómicas y geográficas que existen entre ambos grupos de estudio.

Del desarrollo embrionario propiamente dicho no hemos podido observar los primeros estadios de la serie ontogénica, es decir, las primeras divisiones del huevo y el proceso de blastulación, aunque si nos atenemos a los datos de la bibliografía para el resto de especies de la familia, *S. salamandra* debe presentar una segmentación holoblástica pero asimétrica, en la que las células del polo animal son más pequeñas y se dividen más rápido que las del polo vegetal (Barbadillo, 1989; Gasche, 1939; Wunderer, 1910).

La primera diferencia clara entre los embriones de *S. salamandra* y los de las otras especies de la familia se observa en el estado de faríngula (Fig. 10) y se puede achacar a las proporciones diferentes entre el tamaño del embrión y el de su reserva vitelina. Los embriones de *S. salamandra* se disponen sobre una masa vitelina muy grande en relación al tamaño del propio embrión, lo que queda reflejado en un valor bajo (0,2) de la proporción (a)/(b), mientras que en otras especies como *S. atra* o *Triturus boscai* la masa vitelina es mucho más pequeña y aparece envuelta por el embrión, siendo (a)/(b) siempre superior a 0,5.

Una proporción superior a 0,5 ha sido tomada como un carácter ancestral en anfibios (Collazo & Marks, 1994). La mayoría de especies de urodelos presentan esta proporción alta, lo que les confiere durante las primera fases de desarrollo una morfología característica (Fig. 8). La proporción (a)/(b) inferior a 0,5 se ha visto en especies con características derivadas como las del género *Desmognathus*, algunas de las cuales, como *D. aenus*, tiene desarrollo directo (Marks & Collazo, 1998). En lo que se refiere a la familia Salamandridae, las especies como *Triturus alpestris*, *T. boscai*, *T. helveticus* o *S. atra* presentan todas el estado ancestral del carácter. *S. salamandra*, como se puede apreciar en el estado de faríngula, es la primera especie de la familia que presenta el carácter derivado, esto es, un tamaño del embrión pequeño en relación al tamaño de su reserva vitelina. En los otros órdenes de anfibios, el carácter derivado aparece de una manera desigual. Así, en anuros, esta característica sólo ocurre en el hílido *Gastrotheca riobambae* (Del Pino, 1989), que completa su desarrollo dentro de un saco adosado al dorso de la madre, mientras que en las cecilias el carácter derivado parece más bien una constante (si bien este hecho se basa en una observación personal de las tablas de desarrollo publicadas ya que en ellas no se había calculado el parámetro). Curiosamente, tanto *Gastrotheca riobambae* como el grupo de las cecilias se caracteriza por tener una gran cantidad de vitelo en sus huevos y una segmentación meroblástica (aunque *G. riobambae* es un caso especial, en cuanto a sus procesos de gastrulación y neurulación [Del Pino, 1983]).

No se conocen ni las causas ni el significado o las consecuencias fisiológicas del hecho de que el embrión tenga un tamaño pequeño en relación a su reserva vitelina. Habría que analizar en detalle la relación entre el tamaño de las hembras, el tamaño de los embriones y la cantidad de vitelo producida en todas las especies de la familia Salamandridae para determinar si en *S. salamandra* se ha producido realmente un incremento relativo de la masa vitelina y, si se observa este incremento, debería estudiarse su repercusión en la morfología de las primeras fases de desarrollo que hemos observado y en qué medida pudiera estar asociado o relacionado con la evolución del ovoviviparismo, esto es, la extensión de la retención oviductal de los huevos en esta especie. Una característica de los huevos de urodelos con mucho vitelo es que la pared del blastocele formado después de la gastrulación está constituida por una única capa de células (Keller, 1986). Este mismo hecho se ha constatado en anuros, de nuevo en la especie *Gastrotheca riobambae* (Elinson, 1987). Sería interesante contrastar este hecho en la familia Salamandridae y comprobar si también va asociado al incremento de la masa vitelina en los huevos.

El patrón de las secuencias de desarrollo a partir de la faríngula hasta la eclosión es un patrón relativamente constante en los urodelos (Duellman & Trueb, 1986; Dünker *et al.*, 2000). No existen grandes diferencias en cuanto al orden de aparición de las diferentes estructuras embrionarias. Existen ciertas diferencias en cuanto al momento exacto en el que determinados órganos se desarrollan o en cuanto a sus tasas de desarrollo y, por lo general, estas diferencias están relacionadas con los distintos ciclos vitales. El ciclo de vida ancestral en el orden Caudata comprende la puesta de huevos en el agua (oviparismo), el desarrollo embrionario dentro de los huevos consumiendo la masa vitelina, la eclosión e inicio de la fase larvaria acuática con alimentación activa y, posteriormente, el proceso metamórfico para convertirse en juveniles terrestres (Duellman & Trueb, 1986; Hanken, 1999). Los ciclos de vida más derivados implican el desarrollo directo de los embriones, obviando la fase (y la morfología) larvaria. La secuencia de desarrollo de *Ambystoma maculatum* (Harrison, 1969) se toma como referencia de secuencia de desarrollo asociada a un ciclo con características primitivas, aunque no se trate de un grupo basal dentro de Caudata. El ovoviviparismo de *S. salamandra* puede ser considerado como una estrategia derivada intermedia ya que se puede equiparar fácilmente a la serie primitiva del tipo de *A. maculatum*, aunque también presenta ciertos rasgos derivados como el desarrollo vestigial de los balancines.

El desarrollo de *S. salamandra*, por tanto, presenta una gran similitud al descrito en otras especies de urodelos, exceptuando la relación entre el tamaño del embrión en los primeros estadios de desarrollo y el tamaño de la masa vitelina, así como el desarrollo vestigial de los balancines, más desarrollados en otras especies como *T. boscai* o *T. helveticus* (Barbadillo, 1989). La relación entre el tamaño del embrión y la cantidad de vitelo del huevo es un hecho que puede tener gran importancia y que merece la pena seguir analizando en trabajos posteriores ya que seguramente nos proporcionará más claves sobre la diversificación de las estrategias reproductoras en *S. salamandra*.

Comparación de las secuencias de desarrollo de las salamandras ovovivíparas y vivíparas

Según se desprende de nuestra serie de desarrollo, la ovulación en las hembras ovovivíparas de Mijares ocurre en el inicio del verano, durante la primera quincena de julio. El desarrollo intrauterino se prolonga unos tres meses. La liberación de las larvas ocurriría a finales de octubre (estadio XXI), asociada al desarrollo completo de la morfología larvaria, la eclosión y la total reabsorción del vitelo, aunque en la naturaleza esta liberación puede posponerse unos meses, hasta la llegada de la primavera. Posteriormente se iniciaría la etapa de vida libre acuática y de alimentación activa, periodo con una duración variable. En nuestra serie experimental los procesos metamórficos se iniciaron a finales de octubre, principios de noviembre, aunque en la naturaleza la metamorfosis puede producirse antes del invierno (noviembre-diciembre) o retrasarse hasta la primavera, dependiendo del momento de la liberación (Barbadillo *et al.*, 1999; Joly, 1968; Joly *et al.*, 1994; Salvador & García-París, 2001).

La ovulación y la fecundación en las hembras vivíparas de Oviedo tiene lugar a principios de julio, como en la población de Mijares. Sin embargo, la secuencia de desarrollo de las salamandras vivíparas (*S. s. bernardezi*) presenta grandes diferencias con respecto al patrón de desarrollo descrito para las salamandras ovovivíparas. Discutimos a continuación las diferencias observadas.

1- El número de huevos es más elevado en las hembras vivíparas. Parece claro que, dado el menor tamaño de las hembras vivíparas (Alcobendas & Castanet, 2000; Barbadillo *et al.*, 1999) y el tamaño similar de los huevos en hembras ovovivíparas y vivíparas (Joly *et al.*, 1994; capítulo IV), el esfuerzo reproductor en estas últimas es superior. A esta misma conclusión llegan Thiesmeier *et al.* (1994): según sus cálculos, hasta el 22,4% del peso de una hembra grávida vivípara corresponde a su progenie.

2- En los úteros de las salamandras vivíparas, observamos una protrusión de vitelo en muchos huevos, huevos que posteriormente no siguieron su desarrollo. En algunas especies de anfibios y como resultado del proceso de gastrulación, se forma el llamado "tapón de vitelo" ("yolk-plug"), una masa de células ricas en vitelo que taponan el blastoporo, obliterando la abertura y formando una protuberancia característica (Eakin, 1978). Este tipo de procesos ocurre por lo general en los huevos con una gran cantidad de vitelo. También se ha detectado una estructura similar en los huevos de algunas especies de urodelos que presentaban un desarrollo anormal. Sessions *et al.* (1988), por ejemplo, describen lo que llaman el "Síndrome del Desarrollo Detenido" en especies del género *Triturus* (dentro por tanto de la familia Salamandridae). Cinco de estas especies, *Triturus carnifex*, *T. cristatus*, *T. dobrogicus*, *T. karelini* y *T. marmoratus*, incluidas dentro del subgénero *Triturus*, presentan un heteromorfismo cromosómico peculiar en sus cromosomas 1 que las distingue de todo el resto. Este heteromorfismo es necesario para un correcto desarrollo embrionario. Se trata de un sistema letal equilibrado, en el que sólo los cariotipos heterocigotos-heteromórficos 1A/1B son viables, mientras que los individuos homocigotos 1A/1A o 1B/1B detienen su desarrollo en los primeros estadios embrionarios. Esto provoca que alrededor del 50% de los huevos producidos por estas especies abortará durante el inicio del desarrollo embrionario. Curiosamente, la característica de un gran número de estos embriones es que presentan un blastoporo anormal, con un gran tapón vitelino en la transición gástrula-néurula, lo que va a provocar que el proceso de neurulación sea incorrecto y que los embriones mueran. El heteromorfismo ha sido descrito a partir del patrón de bandas-C en las cinco especies y no se sabe cual es el mecanismo fisiológico o mecánico que provoca el aborto del huevo. Aunque no se ha encontrado en ninguna otra especies de la familia, la hipótesis de la existencia de algún factor similar al descrito que pueda explicar la presencia de tantos huevos abortivos en *S. s. bernardezi* es de lo más atractiva. Contaríamos, en primer lugar, con un marcador genético asociado a esta estrategia reproductora con el que rastrear las poblaciones y así poder com-

pletar el escenario filogeográfico de la evolución del viviparismo planteado en el capítulo anterior. Además, la existencia de un sistema similar que pueda explicar la presencia de tantos huevos que no se van a desarrollar podría aportar nuevas claves para entender cómo pudo haber surgido y evolucionado el viviparismo en esta especie. Todas las especies del género *Triturus* son ovíparas por lo que la presencia de huevos abortivos, más allá del hecho del "despilfarro" energético que puede suponer, no tiene mayores consecuencias. Sin embargo, en *S. s. bernardezi*, estos huevos están sirviendo de alimento para el resto de embriones que sí se desarrolla, estableciéndose un sistema de "matrotrofia indirecta". La existencia de estos huevos abortivos es una de las características más destacadas del viviparismo en *S. s. bernardezi*, aunque aún no sabemos hasta qué punto su presencia ha sido determinante para la evolución de esta estrategia.

3- La tercera diferencia que resaltaremos entre ambas secuencias ontogénicas es la morfología de los embriones ovovivíparos y vivíparos en el estadio IX (Fig. 14 y 44, respectivamente). Los embriones vivíparos llegan a este estadio de desarrollo mucho antes que los ovovivíparos (3-4 días en los primeros y 9 en los segundos). Existe una clara aceleración del desarrollo en los primeros. Además, hay que señalar también que, a pesar de presentar un mismo grado de diferenciación en todas las estructuras, las regiones cefálica y caudal de los embriones vivíparos siguen pegadas a la masa vitelina mientras que en los embriones ovovivíparos ya están claramente separadas.

4- En la Fig. 46 mostrábamos la imagen de un embrión vivíparo en un estadio de desarrollo equiparable al estadio XII ovovivíparo. Las diferencias entre ambos embriones son notables. Destaca la disposición del embrión sobre la masa vitelina que en el embrión vivíparo se ve muy reducida y se encuentra situada en la región caudal con la cola aún pegada a ella, a diferencia de lo que sucede en el embrión ovovivíparo (Fig. 20). La región anterior del cuerpo en los embriones vivíparos se ha diferenciado más rápidamente que la región caudal. Existe una desincronización entre ambas regiones del embrión si las comparamos con un embrión ovovivíparo. Esta desincronización puede asociarse con un proceso heterocrónico de aceleración del desarrollo de la región anterior del cuerpo, asociado a otro proceso de pre-desplazamiento (se adelanta el inicio de la diferenciación de la región anterior) (Alberch *et al.*, 1979). En el embrión vivíparo también se aprecia una posible diferenciación del primer tramo del tracto digestivo, lo que también pueda estar encuadrado dentro de los procesos de aceleración del desarrollo en la porción anterior del embrión.

5- Otra de las diferencias notables es la eclosión: los embriones vivíparos se liberan de las membranas mucho antes que los ovovivíparos. La eclosión se puede producir de diferentes maneras en anfibios: puede ser, por ejemplo, una eclosión

enzimática o mecánica, forzada por el propio embrión (Duellman & Trueb, 1986), aunque no se sabe cuál es el mecanismo implicado en *S. salamandra*. De cualquier manera, si consideramos la eclosión como un evento más dentro de la serie ontogénica, está claro que ésta se produce con más antelación en la serie vivípara que en la serie ovovivípara. Existe por tanto un proceso heterocrónico de pre-desplazamiento (Alberch *et al*., 1979). Los embriones vivíparos eclosionan entre 8 y 9 días después del inicio e nuestra serie de desarrollo, frente a los 80-90 días de los embriones ovovivíparos. Se aprecia otra vez, la aceleración del desarrollo vivíparo que antes señalábamos.

6- En la Fig. 49 mostrábamos las diferencias entre ambas secuencias de desarrollo. En el embrión vivíparo la cabeza presenta un aspecto diferente, posiblemente por la diferenciación y remodelación tempranas de sus estructuras internas. En este estadio, en el que ya se aprecia el surco bucal abierto, aunque no en su totalidad, y una diferenciación clara del primer tramo del sistema digestivo, los embriones vivíparos inician una alimentación activa (Fig. 50). La morfología de los embriones vivíparos pone de manifiesto los procesos heterocrónicos anteriormente descritos, la aceleración asociada al pre-desplazamiento, implicados en la diferenciación de las estructuras de la región anterior del embrión.

La alimentación intrauterina es uno de los aspectos claves de la estrategia vivípara. Está claramente asociada al desarrollo heterocrónico de la parte anterior del cuerpo del embrión, sobre todo en lo que se refiere a la apertura del surco bucal y a la diferenciación del primer tramo del tracto digestivo. Sin este desarrollo precoz, las larvas no podrían alimentarse. Destaca, sin embargo, que en este contexto no hayamos detectado diferencias en el desarrollo de la dentición entre los embriones ovovivíparos y vivíparos. La dentición de los embriones vivíparos parece no seguir el mismo proceso heterocrónico que el resto de estructuras bucales (pre-desplazamiento): los embriones vivíparos se alimentan sin haber desarrollado la dentición larvaria.

La posibilidad de ingerir más alimento, además, favorece la aceleración del desarrollo de los embriones vivíparos. Mientras que los embriones ovovivíparos consumen su vitelo poco a poco, llegan a la eclosión con la masa vitelina completamente reabsorbida e inician la fase acuática de vida libre en la que necesitan alimentarse para completar su desarrollo y metamorfosearse, los embriones vivíparos incorporan una nueva fuente de vitelo a partir de la ingesta de huevos (u otras larvas) para completar su ciclo dentro de los úteros maternos. El resultado es que los vivíparos completan la metamorfosis en los úteros maternos en un tiempo similar al que los ovovivíparos eclosionan e inician su periodo de vida larvaria acuática. No existe, por tanto, una extensión significativa de la retención oviductal de la progenie, a diferencia de otros procesos de evolución del viviparismo. El proceso de extensión es, filogenéticamente hablando, anterior al de la aparición del viviparismo y ocurre en la transición oviparismo-ovoviviparismo, permitiendo la

implantación de esta nueva estrategia reproductora en el género *Salamandra* (ver Capítulo II). El viviparismo evoluciona sobre esta base y en vez de prolongar el periodo de retención para completar el ciclo de desarrollo lo que se produce es una aceleración del proceso ontogénico.

7- En la Fig. 53 se observa cuatro embriones procedentes de un mismo útero en fases de desarrollo muy diferentes. La heterogeneidad en el estado de desarrollo de los embriones vivíparos dentro de los úteros es otra de las características de esta estrategia. No todos los embriones presentan las mismas tasas de desarrollo y las diferencias entre ellos se incrementan cuando los que se desarrollan más rápidamente empiezan a alimentarse activamente. Dado que los embriones más desarrollados tenderán a comerse a los menos desarrollados, podemos pensar que existe una presión selectiva que está favoreciendo la aceleración del desarrollo de los embriones vivíparos.

En resumen, en la secuencia de desarrollo derivada vivípara hemos detectado los siguientes procesos heterocrónicos en relación con la secuencia ovovivípara: en primer lugar, se produce una aceleración de la duración total del desarrollo desde la fecundación hasta la metamorfosis. Esta aceleración se puede observar desde los primeros estadios aunque se ve acelerada hacia el final de la secuencia por el aporte extra de vitelo proveniente de la alimentación intrauterina y quizás sea consecuencia de una presión selectiva marcada por los procesos de canibalismo. En segundo lugar, destacan los procesos de pre-desplazamiento y aceleración en el desarrollo de las estructuras presentes en la mitad anterior del embrión. Mientras que la región caudal sigue pegada a la masa vitelina, en la región anterior del cuerpo se diferencian las estructuras cefálicas y del tracto digestivo, lo que va a permitir, entre otras cosas, el inicio de una alimentación activa precoz. El desarrollo de la dentición no sigue, sin embargo, este patrón heterocrónico. En tercer lugar, se produce un proceso heterocrónico de pre-desplazamiento de la eclosión en la serie vivípara, aunque no sabemos cuáles son los mecanismos físicos o químicos que provocan la ruptura de las membranas de los huevos.

Variaciones en la ontogenia y evolución del viviparismo

Hemos podido establecer la existencia de procesos heterocrónicos durante el desarrollo de las salamandras vivíparas. Sabemos que el viviparismo es una estrategia derivada y pretendemos plantear en este apartado un posible escenario en el que se pueda haber desencadenado la aparición de una novedad evolutiva. Podemos partir de dos hipótesis diferentes, aunque no excluyentes:

(i) los cambios en la secuencia de desarrollo son una consecuencia de los procesos de adaptación (por selección) de los embriones y de las larvas a un nuevo contexto ecológico, como es el desarrollo intrauterino, en el que hay que competir por los recursos disponibles. Esta hipótesis podría identificarse como la aproximación adaptacionista a la aparición del viviparismo.

(ii) la aparición del viviparismo es una consecuencia de procesos heterocrónicos durante la ontogenia, lo que podría asimilarse con una aproximación internalista.

Si siguiéramos una aproximación adaptacionista en nuestro análisis, asumiríamos desde un principio que el viviparismo es el resultado fenotípico de determinadas presiones selectivas, condicionadas seguramente por el ambiente: el viviparismo surge como una adaptación a unas condiciones determinadas del medio. El argumento central del análisis implicaría la búsqueda de los factores desencadenantes, así como la demostración de las ventajas adaptativas de los nuevos caracteres o de la nueva estrategia aparecida. Los procesos heterocrónicos observados serían productos secundarios generados durante la evolución de la nueva estrategia reproductora.

Hart & Wray (1999) argumentan que los procesos heterocrónicos no juegan ningún papel destacable en el origen y evolución de las formas larvarias en anfibios. Insisten en que es suficiente un "programa ecológico de análisis" para explicar la evolución larvaria. El programa ecológico de análisis es un programa adaptacionista en el que los patrones heterocrónicos ontogénicos se interpretan como consecuencia de la selección natural de rasgos adaptativos de embriones y larvas a las circunstancias ecológicas en las que el embrión se desarrolla. Los patrones heterocrónicos observados no se producen por procesos de esta naturaleza sino por otros mecanismos evolutivos como la selección natural. Según estos autores, se puede detectar muchos procesos heterocrónicos durante la ontogenia, pero todos estos cambios parecen derivarse indirectamente de los procesos de selección natural actuando directamente sobre otros rasgos de los individuos, especialmente los que están relacionados con las estrategias vitales. En este contexto, se han propuesto diversos factores ecológicos como catalizadores de la aparición del viviparismo en los diferentes grupos de vertebrados. Quizás la "hipótesis del frío" ("Cold climate hypothesis") recuperada por Shine (1985; 2002) para explicar la evolución de esta estrategia en reptiles, ha sido la más aceptada y reutilizada en otros grupos, incluidos los anfibios. Esta hipótesis asume que los huevos o los embriones que son gestados tendrán una adecuación biológica ("fitness") mayor que si son puestos o incubados, sobre todo en ambientes fríos. La adecuación biológica de la progenie aumentará al incrementarse la temperatura de desarrollo dentro del tracto genital materno por lo que la nueva estrategia reproductora se acabará estableciendo en la población por selección natural. Shine (1995) ha propuesto la llamada "hipótesis de la plasticidad fenotípica" como una extensión menos restrictiva que la hipótesis del frío, en la que sugiere que la prolongación de la retención oviductal aumenta la adecuación biológica de la progenie en cualquier ambiente en el que la temperatura materna difiera de la de la puesta. La hipótesis del frío se ha incorporado directamente para explicar la evolución del viviparismo en diferentes grupos de vertebrados, aunque sin comprobar explícitamente en muchos casos su validez. Joly (1968) y Joly *et al.* (1994) la han utilizado para *Salamandra salamandra*, aunque Dopazo & Koremblum (2000) rechazan esta hipótesis, sirviéndose de la ausencia de correlación entre la distribución altitudinal de las poblaciones de salamandras en el norte de la Península Ibérica y la distribución actual del viviparismo.

Asumiendo un factor ambiental como desencadenante de la aparición del viviparismo y basándonos en los datos que hemos obtenido, podríamos plantear el siguiente escenario evolutivo hipotético. El factor ambiental bien puede ser el frío u otro, como la escasez de agua en los lugares de puesta (no olvidemos que las zonas donde encontramos salamandras vivíparas se corresponden mayoritariamente con terrenos cársticos calcáreos). Ante la falta de condiciones ambientales adecuadas para la puesta, las hembras tenderían a retener las larvas. Dado que las larvas están listas para ser paridas, es muy probable que se produzca la eclosión y, si la retención oviductal se prolonga, que también se produzcan fenómenos de canibalismo intrauterino: la agresividad de las larvas y los fenómenos de canibalismo intraespecífico son frecuentes cuando su densidad en el lugar donde han sido liberadas es muy alta (Reques & Tejedo, 1996). En este nuevo contexto ecológico, se verán favorecidos los individuos que se desarrollen más rápidamente. Podemos predecir que se producirá por selección una progresiva aceleración del desarrollo de los embriones. Consecuentemente con esta aceleración, el nuevo periodo de desarrollo vivíparo acaba teniendo la misma duración que el periodo de desarrollo ovovivíparo desde la fecundación hasta la eclosión y liberación de las larvas (situación que observamos en la actualidad). En este escenario hipotético, los otros dos procesos heterocrónicos de pre-desplazamiento que observamos (eclosión y desarrollo de la porción anterior del cuerpo) se habrían producido secundariamente. Quedaría por explicar la presencia de los huevos abortivos o no fecundados que marca una diferencia clara con el modelo ovovivíparo.

Los programas adaptacionistas plantean problemas a veces de difícil solución. Uno de ellos, reflejado en el escenario evolutivo hipotético desarrollado, es la dificultad para llegar a designar una causa ecológica determinada como catalizadora de la aparición de una novedad evolutiva (en nuestro caso, la evolución del viviparismo) en un linaje (aunque Shine (2002) plantea un diseño experimental específico para ello). La relación de causalidad entre el factor ecológico y la evolución en este caso del viviparismo se establece a partir de la correlación de ambas variables en grupos cercanos. Pero esta correlación puede haberse establecido muy posteriormente a la aparición de la novedad evolutiva. Puede ser el caso de grupos de poblaciones en los que la evolución de la nueva estrategia les haya permitido la colonización de regiones o nichos ecológicos hasta ese momento limitantes. El análisis de la correlación "factor ecológico-viviparismo" nos llevaría a conclusiones erróneas sobre la posible relación causa-efecto entre el factor ecológico y la aparición de la novedad evolutiva y estaríamos entonces ante un ejemplo de exaptación (un carácter seleccionado en origen para una función determinada se "readapta"-cooptación- para una nueva función en la actualidad, según Gould & Vrba, 1982). De este modo y a pesar de que se pueden diseñar experimentos muy detallados que nos permitan eliminar el máximo posible de variables ambientales y establecer una correlación directa e inequívoca entre la aparición de una novedad evolutiva y un condicionante ambiental, resulta muy difícil definir una relación de causalidad entre ambos factores. Ahora bien, probablemente el problema de mayor complejidad implícito en los análisis adaptacionistas reside en la propia definición de adaptación y en cómo demostrar que

un carácter es realmente adaptativo (ver "Part I: Adaptation", pp1-86, en HULL & RUSE, 1998, para una discusión extensa del tema).

A partir del escenario evolutivo hipotético que podríamos plantear bajo una aproximación adaptacionista no conseguimos explicar por si solo satisfactoriamente la aparición del viviparismo en *Salamandra salamandra*. La aproximación internalista al problema elimina la necesidad de justificar previamente el carácter adaptativo y la adecuación biológica del viviparismo, permitiendo abordar su estudio bajo una nueva perspectiva. A través de la aproximación internalista con la que hemos enfocado este capítulo, se demuestra que no es necesario apelar a cambios en un factor ambiental, como puede ser la temperatura o la humedad junto a la adaptación por selección de los individuos a este nuevo ambiente, para explicar la aparición de novedades evolutivas en un linaje. El "paradigma adaptacionista" imperante ha encorsetado en cierta forma la investigación en biología evolutiva. En cambio, las nuevas aproximaciones internalistas pretenden plantear los problemas bajo un prisma radicalmente diferente; al plantear nuevas preguntas se conseguirán nuevas respuestas.

DOPAZO (1995) y DOPAZO & KOREMBLUM (2000) plantearon la presencia de los huevos con su desarrollo detenido como factor que ha desencadenado la aparición del viviparismo. Parten de un escenario en el que la inversión materna en su progenie ha sido moldeada por la selección natural, tendiendo a maximizar el número de descendientes. La aparición en algunas poblaciones de huevos que van a ser utilizados para la alimentación de otros embriones supone un cambio en la funcionalidad del carácter. Surge un nuevo escenario exaptativo (DOPAZO & KOREMBLUM, 2000), en el que la selección natural favorecerá a los embriones o larvas que aceleren su desarrollo, eclosionen rápido y se alimenten del resto de la camada, estableciéndose el fenotipo vivíparo que hemos descrito. El desencadenante de la evolución del viviparismo sería, por tanto, la cooptación de una parte de los huevos como fuente de alimentación para el resto de la progenie.

En nuestro trabajo, hemos profundizado más en la relación entre los procesos heterocrónicos y la estrategia vivípara en *S. salamandra*. Esta estrategia presenta unas características claras: (i) la retención de los embriones y las larvas dentro de los úteros hasta la metamorfosis, (ii) la presencia de huevos abortivos y (iii) el canibalismo intrauterino. Hemos demostrado que no existe una extensión del periodo de retención, sino que, al contrario, los embriones vivíparos completan su ciclo de desarrollo en un tiempo inferior al de los ovovivíparos. Esta aceleración del desarrollo se debe en gran parte a la capacidad de alimentarse activamente dentro de los úteros maternos, capacidad que viene dada por los procesos heterocrónicos descritos. Podemos, por tanto, explicar el viviparismo en *Salamandra salamandra* a partir de los procesos heterocrónicos que hemos analizado en este capítulo. Tanto el pre-desplazamiento de la eclosión como el pre-desplazamiento y la aceleración en el desarrollo de las estructuras situadas en la parte anterior del cuerpo serían suficientes para plantear un escenario posible en el que hubiera evolucionado el viviparismo. La eclosión precoz, por ejemplo, permite la puesta en contacto de los embriones antes aislados dentro de sus membranas. Los fenómenos de canibalismo que se producen permiten el acceso a una nueva fuente de

nutrientes, lo que conduce a la aceleración del desarrollo y a completar los ciclos de desarrollo dentro de los úteros maternos. Asimismo, el pre-desplazamiento y la aceleración en el desarrollo de las estructuras bucales y del sistema digestivo en algunos individuos podrían ser los eventos precursores de la nueva estrategia. Cualquiera de estos procesos heterocrónicos posibilita la alimentación activa de los embriones dentro de los úteros maternos, que es, como decíamos, una de las características clave de la estrategia vivípara en *S. salamandra*.

Tanto en el escenario adaptacionista como en el internalista, nos referimos al medio intrauterino en el que se desarrollan los embriones y larvas vivíparos como "un contexto ecológico nuevo". En este contexto ecológico nuevo, como ya hemos visto, los individuos están sujetos a presiones selectivas marcadas básicamente por los fenómenos de canibalismo intrauterino y diferentes, por tanto, respecto a las que experimentan las larvas ovovivíparas liberadas en una charca. En ese marco, la selección natural no podrá considerarse como la fuerza generadora de la aparición del viviparismo, pero sí jugará un papel relevante en la definición o perfilado de alguno de los rasgos característicos de la nueva estrategia. Hay otros factores, además, que no hemos mencionado hasta ahora, que también tienen una gran importancia para el desarrollo de los embriones y larvas como son las condiciones físicas del nuevo medio. Factores como la temperatura ejercen una gran influencia sobre el desarrollo de los embriones y larvas, modulando tanto sus tasas de crecimiento como de diferenciación. En el siguiente capítulo, analizamos experimentalmente la influencia de estos factores en el crecimiento de varias familias de larvas de *S. salamandra*, para completar el dibujo de la diversificación de las estrategias reproductoras en esta especie.

Como mencionábamos al comienzo de ese capítulo, las dos aproximaciones adaptacionista e internalista, aunque diferentes, no son excluyentes. Se puede analizar la aparición de cualquier novedad evolutiva en un linaje a partir de las dos interpretaciones. Con las aproximaciones internalistas no se pretende negar la existencia de la selección natural o su importancia dentro del procesos evolutivo, sino reivindicar el papel de lo procesos ontogénicos como motor evolutivo, papel asignado en exclusiva a la selección natural por la síntesis neo-darwiniana. Sin embargo, tanto los procesos de selección como los heterocrónicos son fundamentales en la evolución, como lo han sido en la diversificación de los modos de reproducción en *S. salamandra*.

Uno de los problemas que plantea la aproximación internalista, es la ausencia de datos disponibles sobre los mecanismos genéticos, morfogénicos y fisiológicos implicados en muchos de las heterocronías que hemos analizado, lo que limita enormemente las interpretaciones que podemos realizar. Un ejemplo es la ausencia de datos sobre el mecanismo de la eclosión o sobre las bases fisiológicas de la extensión de la retención oviductal en el género *Salamandra*. La eclosión en los anfibios suele ser mecánica o enzimática (Duellman & Trueb, 1986). Antes de la eclosión, los embriones de muchas especies de anuros y urodelos suelen desarrollar unas glándulas unicelulares ectodérmicas que contienen enzimas (Petranka *et al.*, 1982). La eclosión se produce por la liberación de estas enzimas, que digieren parcialmente las envueltas del huevo, y se completa

con los movimientos musculares del propio embrión, si bien no sabemos cómo se produce este fenómeno en *S. salamandra*. Urge, asimismo, realizar un estudio comparado exhaustivo del control endocrino de los diferentes ciclos reproductores (Joly *et al*., 1994). Hormonas como la progesterona o la presencia de cuerpos lúteos, entre otros factores, están directamente relacionados con la retención de los huevos o la progenie dentro del tracto genital materno; un cambio en la estrategia reproductora implicará, con seguridad, cambios en este control hormonal y su análisis nos permitirá completar el estudio de las diferentes estrategias reproductoras en *S. salamandra*.

Así como la genética se integró y moldeó la teoría evolutiva en la primera mitad del siglo XX y el análisis de los procesos de desarrollo se incluyeron en la teoría a partir de los años 1970 o 1980 junto con los nuevos datos generados por la biología molecular, una de las carencias de la biología evolutiva actual residiría en la falta de integración de los procesos fisiológicos, para crear así un cuerpo teórico sólido en fisiología evolutiva. Además de brindarnos una información mecanicista muy valiosa para plantear e interpretar cualquier hipótesis evolutiva, el desarrollo de la fisiología evolutiva serviría de lazo de unión entre las aproximaciones externalistas-adaptacionistas e internalistas, contribuyendo a la formalización de una nueva síntesis de la biología evolutiva, tan necesaria hoy en día.

IV- METAMORFOSIS Y PLASTICIDAD FENOTÍPICA

1. Introducción

Por lo general, las especies presentan a lo largo de su rango de distribución variaciones entre poblaciones tanto genéticas como morfológicas o etológicas. Estas variaciones pueden tener un origen histórico (filogenético) o estar más bien relacionadas con factores ambientales. Las variaciones suelen ser interpretadas dentro de la tradición neodarwiniana como adaptaciones, representando tanto las soluciones adaptativas que han sido seleccionadas en ambientes heterogéneos, como el potencial evolutivo de la especie para afrontar futuros cambios (aptaciones, según GOULD & VRBA, 1982). Para investigar la historia evolutiva de unos organismos y comprender los procesos que se han producido o los mecanismos de diversificación que se están produciendo en la actualidad, uno de los pasos necesario será el descifrar el origen de la variabilidad geográfica intraespecífica que observamos.

Esto es si cabe más cierto en anfibios, debido seguramente a su ciclo de vida complejo (HANKEN, 1999). Mucho se ha escrito en los últimos años sobre la importancia de diferentes factores ambientales tanto abióticos (p. ej. la temperatura) como bióticos (p. ej. la densidad de larvas en una charca o la cantidad de nutrientes) en el desarrollo de los individuos durante las diferentes fases de su vida (KAPLAN, 1991; WEST-EBERHARD, 1989). La variabilidad intraespecífica durante el periodo larvario, por ejemplo, es un rasgo notorio en muchas especies de anfibios en las que es frecuente observar diferencias en los tamaños de los huevos, en la duración de los periodos larvarios, en el tamaño de los embriones al eclosionar o en el de las larvas al metamorfosearse (DUELLMAN & TRUEB, 1986; KAPLAN, 1998). Pero además, estas variaciones, que por lo general ocurren entre poblaciones, también pueden darse dentro de una misma población o incluso dentro de una misma puesta. Las variaciones fenotípicas tienen una influencia directa en las etapas posteriores del desarrollo de los individuos, llegando a condicionar en gran medida al individuo adulto (KAPLAN, 1998).

Un fenotipo es el resultado final de las normas generadoras dictadas por un genotipo determinado, normas que interactúan en un ambiente preciso durante la ontogenia. Pero lejos de estar tratando con un sistema cerrado y determinista, el proceso ontogénico se encuentra abierto a distintos tipos de "sugerencias" tanto internas como externas que son capaces potencialmente de modificar el resultado fenotípico final. Así, por ejemplo, se pueden generar diferentes fenotipos a partir de un mismo genotipo cuando alteramos las condiciones ambientales durante el desarrollo, lo que se conoce como plasticidad fenotípica (SCHLICHTING & PIGLIUCCI, 1998). El conjunto de fenotipos generados por un mismo genotipo expuesto a un gradiente ambiental se puede representar como una función denominada "norma de reacción". En los últimos años, se han incrementado notablemente el número de trabajos relacionados con la plasticidad fenotípica en diferentes organismos, poniendo de manifiesto que esta capacidad, y no sólo la selección natural de polimorfismos genéticos en las poblaciones, puede haber jugado un papel relevante en la evolución de las larvas y de los anfibios adultos (WEST-EBERHARD, 1989).

Parte de los resultados de este capítulo han sido enviados para su publicación en: Alcobendas, M.; D. Buckley y M. Tejedo. "Variability in survival, growth and metamorphosis in the larval fire salamander (*Salamandra salamandra*): effects of larval birth size, sibship and environment" **Herpetologica**: en revisión.

Si exponemos varios grupos de individuos relacionados genéticamente (clones, familias) a unas condiciones ambientales variadas (tratamientos), podremos representar la norma de reacción de cada grupo como un gráfico (fenotipos generados frente a ambientes determinados para cada familia o clon) (PIGLIUCCI, 1996). Sobre este espectro de fenotipos generados, podremos analizar qué factor o factores son los responsables de las semejanzas o diferencias fenotípicas de la población. Para esto, se suele proceder llevando a cabo un análisis causal de la varianza tanto fenotípica como genotípica, incluyendo distintos tipos de estudios como pueden ser el análisis de las correlaciones genotípicas y fenotípicas o las estimas de heredabilidad. La varianza fenotípica total observada puede ser explicada a partir de tres fuentes de variación: genotípica (que representa las diferencias en las respuestas medias entre genotipos en los diferentes ambientes), ambiental (que cuantifica el efecto medio de los tratamientos entre los genotipos) y de la interacción "genotipo" x "ambiente" (que calibra la variación genética de la norma de reacción en un ambiente determinado) (FALCONER, 1989; PIGLIUCCI, 1996). Hay tres factores responsables de las variaciones con base genética: la varianza genética aditiva, que reúne los efectos aditivos de los alelos dentro y entre los loci, (ii) la varianza debida a los efectos de dominancia de los alelos y (iii) los fenómenos de epistasia entre los loci. Estos tres factores juntos definen lo que se conoce como la "heredabilidad en sentido amplio" (FALCONER, 1989) de un rasgo o carácter, componente que explica hasta qué punto el carácter está determinado genéticamente. La varianza ambiental incluye todas las variaciones con origen no genético que pueden influir en el fenotipo final, tales como factores nutricionales o ambientales (por ejemplo climatológicos). En este grupo también se incluyen los llamados efectos maternos, otra fuente de factores no genéticos que pueden regular o inducir cambios fenotípicos en la descendencia. Podemos discriminar entre dos tipos de efectos maternos (FALCONER, 1989): (i) cuando el valor fenotípico de un rasgo determinado de la madre influye directamente en el valor fenotípico de este mismo rasgo en su descendencia y (ii) cuando las variaciones en los rasgos de la descendencia no están relacionados directamente con el fenotipo materno si no con las condiciones ambientales o el estado fisiológico experimentado por la madre. La influencia de los efectos maternos suele ser más relevante durante las primeras fases del desarrollo. Además, la duración de su influencia es variable y su expresión depende en gran medida de las condiciones ambientales en las que se desarrolla la descendencia (BERNARDO, 1996). Como hemos dicho, los efectos maternos se encuadran dentro de los factores de la varianza ambiental. Ahora bien, el valor fenotípico materno que influye en el rasgo fenotípico de la descendencia también puede ser descompuesto como cualquier otro fenotipo en su componente ambiental y en su componente genotípico (WADE, 1998). El componente genético de los efectos maternos es particularmente interesante ya que representa un mecanismo especial de "coevolución" entre el ambiente de los progenitores y el fenotipo de la descendencia.

Los efectos maternos en las especies de anfibios que no presentan cuidado parental se reducen básicamente a la "inversión" materna en los huevos. La relación entre el tamaño de los huevos y la adecuación biológica (o "fitness") de la descendencia ha sido

puesta en evidencia en diferentes trabajos (AZEVEDO *et al.*, 1997; ROACH & WULFF, 1994; aunque ver también KAPLAN, 1991; KAPLAN & KING, 1997). Se ha comprobado que el tamaño de los huevos puede influir directamente sobre diferentes factores como las tasas de desarrollo o el tamaño de los individuos al eclosionar y, por tanto, el de las larvas y el tamaño final del adulto (KAPLAN, 1998). Los efectos del tamaño de los huevos están por otra parte modulados por factores ambientales como la temperatura o la cantidad de comida disponible (BERVEN & CHADRA, 1988; KAPLAN, 1992). Muchos anfibios, durante su fase larvaria, ocupan charcas o cursos de agua temporales. Estos hábitats pueden desecarse con facilidad siendo por tanto altamente impredecibles; factores como su duración, la cantidad de comida o la temperatura del agua varían enormemente (NEWMAN, 1992) por lo que la fase larvaria acuática de los anfibios que se desarrollan en estos ambientes impredecibles está sujeta a una fuerte selección. Analizando el comportamiento de diferentes especies en estos ambientes tan cambiantes, se ha propuesto que la plasticidad fenotípica de los sistemas implicados podría ser considerada un rasgo adaptativo que ha evolucionado por selección natural cuando es capaz de desarrollar un fenotipo óptimo en al menos dos ambientes diferentes (VIA, 1987). No todos los sistemas pueden desarrollar esta capacidad plástica adaptativa a causa de diferentes restricciones como pueden ser (i) la falta de varianza genética ya sea en plasticidad ("genotipo" x "ambiente") o (ii) dentro de los diferentes ambientes, (iii) la correlación genética entre caracteres en los diferente ambientes o (iv) la existencia de compromisos ("trade-offs") genéticos entre rasgos relacionados con la adecuación biológica ("fitness") (VIA & LANDE, 1985). En estos casos, el potencial evolutivo de la plasticidad fenotípica se ve mermado.

Como decíamos en la introducción general, la variabilidad fenotípica de *Salamandra salamandra* en la Península Ibérica es extraordinariamente grande. Destaca, además del polimorfismo en estrategias reproductoras, la variabilidad en el tamaño, en los patrones de coloración y en la forma del hocico. Las salamandras adultas vivíparas (*S. s. bernardezi* y *S. s. fastuosa*) presentan, a parte de un patrón de coloración rayado y un hocico corto y redondeado característico, un tamaño significativamente menor que en el resto de la Península, con la excepción de las poblaciones de alta montaña del centro peninsular (*S. s. almanzoris*) presentes en las sierras de Gredos y del Guadarrama (ALCOBENDAS & CASTANET, 2000; SALVADOR & GARCÍA-PARÍS, 2001). Estas últimas también presentan un tamaño pequeño, pero acompañado de un patrón de manchas, un hocico puntiagudo y una reproducción ovovivípara. En el otro extremo se encuentran las poblaciones de salamandra de Ronda (*S. s. longirostris*), también ovovivíparas y manchadas pero con un tamaño significativamente mayor al resto de salamandras de la península.

En un estudio reciente, ALCOBENDAS & CASTANET (2000) analizaron la influencia relativa de los factores internos (genéticos) y externos (ambientales) sobre el crecimiento óseo y el tamaño de las salamandras adultas. Estos autores concluyeron que la variabilidad de los tamaños de las salamandras estaría asociada por lo general a las condiciones ambientales experimentadas a lo largo de la vida de los individuos (condiciones que determinan el periodo de actividad y por tanto de crecimiento), salvo en el caso de las salamandras vivíparas del norte peninsular en las que existiría un componente

interno (genético) que determina una tasa de crecimiento en los adultos más lenta que en las demás poblaciones, manteniendo consecuentemente un tamaño corporal significativamente menor. El caso de *S. s. longirostris* también es especial ya que estas salamandras experimentan un crecimiento rápido y continuo durante más años que el resto de poblaciones, por lo que acaban teniendo un tamaño significativamente mayor.

De una manera general, en este capítulo pretendemos estudiar el papel que desempeña la plasticidad fenotípica y los efectos maternos como motores evolutivos en *Salamandra salamandra*. Queremos analizar de qué manera influyen dos factores ambientales (la cantidad de nutrientes y la temperatura) en el desarrollo larvario de las salamandras y qué variabilidad fenotípica puede llegar a generarse alterando experimentalmente dichas condiciones ambientales. El diseño experimental que hemos preparado nos permitirá, además, analizar la importancia relativa de los diferentes factores causales a la hora de generar la varianza fenotípica observada (tales como los efectos maternos, la varianza genética o ambiental, etc.).

Para ello, hemos criado larvas de cinco hembras diferentes en cuatro ambientes de temperatura y comida distintos. De este modo hemos podido estudiar las trayectorias ontogénicas de las diferentes familias de larvas en los cuatro ambientes experimentales (normas de reacción), analizando las variaciones de algunas variables características del desarrollo larvario como son las tasas de supervivencia, las tasas de crecimiento, la duración del periodo larvario o el tamaño final de las larvas al metamorfosearse. También hemos estudiado el efecto de la variación de un rasgo presumiblemente inducido maternalmente, como es el tamaño al nacer de las larvas, sobre estas variables.

En última instancia, nuestro propósito es intentar relacionar los resultados obtenidos con la aparición del viviparismo en la salamandra común. ¿Qué peso específico puede llegar a tener el ambiente (como modulador de la expresión fenotípica) en la aparición de las novedades evolutivas? ¿Puede explicarse (al menos parcialmente) la aparición de una nueva estrategia reproductora en esta especie a partir de los efectos maternos y la plasticidad fenotípica de su sistema ontogénico?

2. Material y Métodos

Capturamos cinco hembras grávidas de salamandra (*S. s. bejarae*) en el Puerto de Mijares (Ávila) en su vertiente meridional (diciembre, 1994). Localizamos los ejemplares en una zona de pinares en los que se encuentran varios riachuelos y regatos donde las hembras hacen las puestas de larvas. Las puestas suelen producirse al final del invierno o principio de primavera (ver Cap. III). Las larvas se desarrollan en el agua durante un tiempo variable (entre dos y seis meses) metamorfoseándose antes de que llegue el invierno o esperando ya a la primavera, si han sido liberadas durante el invierno, y antes del verano si fueron liberadas durante la primavera ya que muchos de estos cursos de agua suelen secarse durante el verano, que suele ser bastante seco y caluroso.

Una vez en el animalario cada hembra fue colocada en un terrario con musgo y un recipiente con agua en el que pudieran liberar las larvas, lo que hicieron a las pocas semanas de la captura (entre el 10 y 20 de Enero).

2.1 Diseño experimental

Para llevar a cabo esta parte del estudio, criamos las larvas de las cinco hembras (número total de larvas N = 209) en diferentes condiciones ambientales. Las larvas se criaron en dos habitaciones con temperaturas distintas (una a baja temperatura –entre 15ºC y 18ºC- y otra a temperatura alta –entre 22ºC y 25ºC). Las alimentamos con larvas congeladas de quironómidos, estableciendo también dos pautas de alimentación diferentes (Mucha comida: alimentación tres veces por semana; Poca comida: alimentación una vez por semana. En todos los casos, las larvas fueron alimentadas *ad libitum*). De esta forma, creamos cuatro ambientes experimentales: alta temperatura-mucha comida (TC), alta temperatura-poca comida (Tc), baja temperatura-mucha comida (tC) y baja temperatura- poca comida (tc). Criamos entre 9 y 12 larvas de cada hembra en cada uno de estos ambientes.

Colocamos cada larva en un contenedor de plástico (capacidad: 300 ml) en un volumen aproximado de agua de 200 ml. Los contenedores fueron distribuidos aleatoriamente dentro de cada tratamiento para evitar que un posible efecto de posición pudiese alterar los resultados de los análisis (heredabilidad, covariaciones genéticas, etc.).

2.2 Datos analizados y su tratamiento

Las larvas fueron medidas (longitud total; error de 0,5 mm) y pesadas (error de 0,01 g) al día siguiente de su nacimiento. Estas medidas se repitieron cada catorce días hasta que completaron su metamorfosis. Consideramos la reabsorción total de las branquias como el indicador del final de la misma. Obtuvimos, de esta manera, un patrón de crecimiento para cada larva representado a partir de las siguientes variables: fecha de nacimiento, peso y talla al nacer y cada catorce días, fecha de la metamorfosis (o lo que es lo mismo, duración del periodo larvario) y peso y talla al final de la metamorfosis. También analizamos las tasas de crecimiento basadas en la masa específica de cada larva siguiendo la fórmula de Sinervo & Adolph (1989):

$$\text{Tasa de crecimiento} = [\ln(\text{masa}_{t2}) - \ln(\text{masa}_{t1})]/t2\text{-}t1,$$

siendo t1 y t2 las fechas de nacimiento y metamorfosis respectivamente. Todas las variables fueron $\log_e$ transformadas para respetar las asunciones de normalidad y homocedasticidad.

Analizamos las tasas de supervivencia con el módulo “Visual Generalized Linear Models” (GLZ) del programa Statistica 5.5 (Statsoft, Inc. 1999), en el cual la variable dependiente sigue una distribución binomial y hay que ajustar sus valores a partir de una función “Logit Link”, obteniendo los parámetros de la función con una estimación de “Máxima Verosimilitud”. También comparamos las tasas de crecimiento medio para cada

familia de larvas por medio de un análisis de varianza multifactorial (MANOVA) con repetición, para determinar si eran paralelas o no. Comparamos el patrón de las curvas de crecimiento examinando la interacción "familia" x "tiempo". Una interacción positiva implicaría que existe variabilidad entre las familias en las tasas de crecimiento a lo largo del tiempo; si esta interacción fuese negativa, asumiríamos que las trayectorias de crecimiento de todas las familias son paralelas.

Análisis de la variación genética del crecimiento y de los rasgos metamórficos

Basamos la estimación de la heredabilidad de los rasgos metamórficos (tamaño al metamorfosearse, duración del periodo larvario) en un análisis de covarianza en familias de "hermanos completos" (full-sib covariance) de todas las larvas. Además de los efectos epistásicos, la covarianza en familias de hermanos completos analiza e incluye los efectos debidos a la dominancia, los efectos maternos no genéticos y los efectos debidos al ambiente común en el que se desarrolla la familia. Todos estos efectos se confunden con los efectos aditivos de los genes (Roff, 1997) por lo que el análisis de la covarianza nos da una estima de la heredabilidad "en un sentido amplio". Los efectos maternos no genéticos contribuyen a la covariación de los hermanos, por lo que se incrementa la estimación de la heredabilidad (Wilham, 1963). Este efecto, mediado básicamente por el tamaño de las larvas al nacer, afecta bastante como veremos más adelante a las variables metamórficas analizadas. Por esto, las estimaciones de las heredabilidades y las covarianzas genéticas se calcularon a partir de los valores residuales del peso al nacer.

Para estimar los componentes causales de la varianza dentro de cada tratamiento, empleamos el programa nf3 del paquete informático "Quercus" (Shaw & Shaw, 1992). Este programa estima los componentes ambientales y genéticos de la varianza fenotípica siguiendo un método de "Máxima Verosimilitud Restringida" (REML: del inglés Restricted Maximum Likelihood) basado en el procedimiento descrito en Shaw (1987). En nuestro diseño con familias de hermanos completos y sin disponer de medidas u otros datos de los parentales, el programa calcula el componente genético en un sentido amplio (i.e., no distingue entre los efectos aditivos, de dominancia y maternos). Para comprobar si alguno de los componentes de la varianza es significativamente diferente de cero, comparamos la funciones de "log likelihood" (L_{max}) para las estimaciones no restringidas con L_0, el "log likelihood" de las estimaciones bajo la hipótesis nula. L_0 se obtiene restringiendo a 0 el valor de los componentes que queremos analizar. Si tanto el análisis del modelo alternativo (restringido) y del modelo de la hipótesis nula (no restringido) convergen con valores aceptables, la distribución asintótica de $2*(L_{max}- L_0)$ sigue una distribución Chi-cuadrado con n grados de libertad, donde n es el número adicional de componentes restringidos en la hipótesis nula. Unos valores significativamente altos de $2*(L_{max}- L_0)$ implicarían que el modelo restringido (modelo alternativo) se ajusta mejor a los datos que el modelo de la hipótesis nula (Manly, 1985).

Para analizar el grado de plasticidad fenotípica de los rasgos metamórficos en los diferentes ambientes, realizamos un modelo mixto de ANCOVA de dos vías con

un factor ambiental y otro familiar y la masa de las larvas al nacer como variable independiente. El factor ambiental es la combinación de los tres tratamientos para los que se consiguieron metamórficos (TC, tC, tc). Utilizamos dos combinaciones distintas de los ambientes para definir dos gradientes ambientales: el primero, "variación de la temperatura", combinando los tratamientos TC y tC y el segundo gradiente, "variación de la comida", combinado los tratamientos tC y tc. La interacción "familia" x "ambiente" representa la variación de las respuestas de los diferentes genotipos (las diferentes familias) en las distintas condiciones ambientales de comida y temperatura; una interacción significativa implicaría cierta variabilidad genética en la plasticidad. Para llevar a cabo el análisis, consideramos "temperatura" y "comida" como efectos fijos, mientras que consideramos las familias como el efecto aleatorio, ya que representan muestras tomadas aleatoriamente dentro de una población mucho más amplia. Asimismo y ya que tratábamos con tamaños de muestra desiguales utilizamos el método Tipo III de suma de los cuadrados (PROC GLM en el programa SAS; SAS INSTITUTE INC, 1990) que tiene en cuenta el tamaño desigual de las celdas y realiza pruebas ortogonales de las hipótesis, con lo que se obtiene una medida más conservadora de los efectos de los tratamientos.

También calculamos las correlaciones genéticas dentro de cada ambiente siguiendo dos procedimientos diferentes. En primer lugar, nos basamos en el método de "Máxima Verosimilitud Restringida". Este método separa la covariación entre las medidas del tamaño de las larvas al nacer y de la duración del periodo larvario y el tamaño al metamorfosearse. Además, también estimamos la covariación entre la duración del periodo de desarrollo y el tamaño de las larvas al metamorfosearse después de controlar el efecto del tamaño de las larvas al nacer. El segundo método que empleamos para la determinación de correlaciones genéticas fue el método de "Medias Familiares", relacionando entre familias las medias familiares de cada rasgo con la correlación r_m producto-momento de Pearson (VIA, 1984). El tamaño ajustado de las larvas al metamorfosearse y la duración del periodo en los distintos ambientes fueron considerados caracteres diferentes aunque potencialmente correlacionados (FALCONER, 1989).

En este capítulo vamos a analizar la influencia del tamaño inicial de las larvas sobre su desarrollo larvario y sus posibles consecuencias sobre el desarrollo adulto. Para completar el estudio sería necesario contar con los valores de los tamaños de los huevos. Esto entraña una gran dificultad al estar trabajando con un especie ovovivípara ya que necesitaríamos sacrificar un gran número de hembras grávidas para conseguir datos estadísticamente significativos sobre la relación entre el tamaño de las hembras, el número de huevos y el tamaño de los mismos. Por ello, vamos a contar con los datos de unas pocas hembras sacrificadas para llevar a cabo el estudio comparado del desarrollo temprano de larvas ovovivíparas y vivíparas a través del crecimiento *in vitro* de embriones (Cap. III). Medimos el tamaño de los huevos de tres hembras ovovivíparas y tres vivíparas en un lupa Zeiss SZH10 con un calibre incorporado, antes de iniciar su cultivo *in vitro*.

Fig. 1: Peso medio (± 1 ES) de cada familia de larvas en los tres tratamientos experimentales desde su nacimiento hasta la aparicíon de los primeros metamórficos (semana 14 en TC y tC y semana 22 en tc).

3. Resultados

En la Fig. 1 hemos representado las curvas de crecimiento de cada familia de larvas en los tratamientos TC, tC y tc desde su nacimiento hasta la metamorfosis. Como se puede observar, las curvas siguen una tendencia muy similar entre las familias. Las diferencias más claras se aprecian en la duración del periodo larvario y en el tamaño de las larvas el metamorfosearse. En los tratamientos con abundancia de comida (TC y tC), la duración del periodo larvario es menor (alrededor de 14 semanas) que en el tratamiento con poca comida (tc, alrededor de 22 semanas). Según se desprende de las curvas, las larvas de los tratamientos TC y tc se metamorfosean con un tamaño menor que las larvas del tratamiento tC. Además, podemos observar que las larvas de la hembra 5 son menores que las del resto de hembras y que la diferencia de tamaños parece pronunciarse más durante el tratamiento tc.

Efecto del tamaño de las larvas al nacer sobre la supervivencia, el crecimiento y la metamorfosis

El tamaño medio de las larvas al nacer fue de 0,15 ± 0,08 g (rango entre 0,08 g y 0,23 g, N = 209). La identidad de las madres explica la mayor parte de la variación obser-

Fig. 2: Tasas de supervivencia (en porcentaje) de las cinco familias de larvas en los diferentes ambientes experimentales.

vada (heredabilidad en sentido amplio, incluyendo los efectos maternos no genéticos, H^2 = 0,94; χ^2= 96,74; P<0,00001; N = 209). El tamaño medio de las larvas de la hembra #5 fue significativamente más pequeño que el del resto de las hembras (Test de Tukey HSD para tamaño de muestras desiguales, P<0,005 para todas las comparaciones *post-hoc*).

Encontramos asimismo diferencias entre las tasas de supervivencia en los distintos ambientes, así como entre las familias dentro de cada ambiente (Fig. 2). Ninguna larva completó la metamorfosis en el tratamiento Tc. En el tratamiento TC, la tasa de supervivencia fue del 71,7%, mientras que en los tratamientos tC y tc las tasas fueron 98,2% y 98,1% respectivamente. La diferencia de tasa entre el tratamiento TC y los otros dos es estadísticamente significativa (test de diferencia entre dos porcentajes, p>0,001 en ambos casos [Brown & Hollander, 1977]). En el tratamiento TC, las diferencias en supervivencia vienen determinadas por el tamaño de las larvas al nacer (χ^2 = 5,07; P = 0,02): las larvas más grandes viven más tiempo que las pequeñas. Pero si controlamos el efecto del peso al nacer, la identidad materna también tiene una influencia clara en la supervivencia de las larvas en este tratamiento (χ^2 = 19,68; P < 0,0002): las larvas de las hembras #4 y #5 vivieron menos tiempo que las de resto. No hubo ninguna larva que llegara a metamorfosearse en el tratamiento Tc, existiendo diferencias en la longevidad de las larvas atribuible de nuevo a la identidad de las madres ($F_{4,40}$ = 7,23; P = 0,0002). En los tratamientos tC y tc, las diferentes familias no contribuyen por igual a las tasas de supervivencia. La identidad de la hembra, por tanto, explica de nuevo la variación en supervivencia (χ^2 = 84,70; P<0,0001), siendo las larvas de la hembra #4 las más variables dentro de cada tratamiento. Existe una covariación positiva entre el peso al nacer de las larvas y su longevidad (r = 0,39; P = 0,01; N = 42), aunque una vez que controlamos este efecto (peso al nacimiento) la identidad materna

Tabla 1: Correlación entre el tamaño de las larvas al nacer y los tamaños a lo largo del crecimiento. En negrita, valores significativamente diferentes de 0, p<0,00001; **a**: p = 0,02; **b**: p = 0,0003; **ns** = no significativo.

SEMANA	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
TC (N = 49)	**0,54**	**0,41**	0,36 (a)	0,19 (ns)	0,30 (ns)	0,23 (ns)				
tC (N = 55)	**0,86**	**0,83**	**0,8**	**0,72**	**0,65**	**0,57**	0,49 (b)			
tc (N = 53)	**0,89**	**0,89**	**0,88**	**0,81**	**0,84**	**0,81**	**0,79**	**0,77**	**0,8**	**0,61**

sigue teniendo influencia sobre su supervivencia ($F_{4,39}$=4,89; P = 0,003): las larvas de las hembras #4 y #5 fueron, en general, las menos longevas de todas.

El tamaño inicial de las larvas influye en su crecimiento posterior. En la Tabla 1 mostramos la correlación entre la masa de las larvas al nacer y el tamaño a lo largo del crecimiento y en los diferentes ambientes. Se puede observar que en el tratamiento TC, deja de existir una covariación entre el tamaño inicial y los tamaños subsecuentes después de seis semanas de crecimiento. En los tratamientos tC y tc, sin embargo, esta covariación se mantiene durante todo el desarrollo larvario.

Tabla 2: Correlaciones fenotípicas y genéticas entre el tamaño de las larvas al nacer y los rasgos metamórficos analizados (Tamaño en la metamorfosis, duración del periodo larvario y tasas de crecimiento basadas en la masa específica de las larvas). $\mathbf{r_p}$: correlación fenotípicas; $\mathbf{r_m}$: producto-momento de Pearson; $\mathbf{r_G}$: estimación de REML: En negrita, correlaciones que no significativamente diferentes de 0; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

	Tamaño	Duración	Crecimiento
TC	r_p = 0,06 ns r_m = 0,25 ns cov_G = 0,004, r_G = 0,14 χ^2 = 0,04 ns	r_p = -0,05 ns r_m = -0,27 ns cov_G = -0,008, r_G = -0,44 χ^2 = 0,29 ns	**r_p = -0,51 **** r_m = -0,30 ns cov_G = -0,012, r_G = -0,18 χ^2 = 0,039 ns
tC	r_p = 0.05 ns r_m = 0.40 ns cov_G = 0.012, r_G = 0.40 χ^2 = 0.56 ns	**r_p = -0,28*** r_m = -0,62 ns cov_G = 0,005, r_G = 0,28 χ^2 = 0,24 ns	**r_p = -0,71 ***** **r_m = -0,89 *** **cov_G = -0,168**, r_G = -0,93 **χ^2 = 9,55 ****
tc	**r_p = 0.32 *** r_m = 0.46 ns **cov_G = 0.016, r_G = 0.61** **χ^2 = 4,59 ***	**r_p = -0,39 **** r_m = -0,34 ns cov_G = -0,001, r_G = -0,11 χ^2 = 0,033 ns	**r_p = -0,55 ***** r_m = -0,64 ns **cov_G = -0,026, r_G = -0,74** **χ^2 = 5,22 ***

En la Tabla 2, mostramos las correlaciones fenotípicas y genéticas entre el tamaño inicial y los caracteres metamórficos. En el ambiente tc, encontramos una covariación positiva entre el tamaño de las larvas al nacer y su tamaño en la metamorfosis, covariación tanto genética como fenotípica (estimas de REML). En los tratamientos con bajas temperaturas, encontramos además una correlación fenotípica negativa entre el tamaño inicial y la duración del periodo larvario. Asimismo, en todos los tratamientos existe una correlación fenotípica negativa entre el tamaño inicial y las tasas de crecimiento basadas en la masa específica. Además, también existe una covariación genética entre ambos rasgos en los tratamientos con temperatura baja.

Variación en las distintas familias del crecimiento larvario y de los rasgos metamórficos analizados

Las estimas de la heredabilidad en sentido amplio del tamaño larvario después de diez semanas de crecimiento, estimas basadas en los valores residuales del peso al nacer, muestran que no existe variabilidad entre familias en lo que a las tasas de crecimiento específico se refiere (Tabla 3). En la Fig. 1 están representados los perfiles de crecimiento de cada familia en cada ambiente desde el nacimiento hasta la aparición de los primeros metamórficos (semana 14 en los tratamientos TC y tC y semana 22 en el tratamiento tc). Como se puede ver con un test de MANOVA (Análisis de la Varianza Multifactorial) con repetición (Tabla 4), las larvas presentan un crecimiento continuo a lo largo del tiempo aunque la respuesta media de crecimiento difiere entre las familias. Ahora bien, la interacción "familia" x "tiempo", que mide la variación que puede ser atribuida a diferencias en las tasas de crecimiento entre familias, no fue significativa para ningún tratamiento. Por lo tanto, la tasa de crecimiento medio de las larvas a lo largo del tiempo no difiere entre las familias.

Tabla 3: Heredabilidades (en sentido amplio). **Tamaño I**: tamaño de las larvas a las 10 semanas de crecimiento; **Tamaño II**: tamaño en la metamorfosis; **Duración**: duración del periodo larvario; **Crecimiento**: tasas de crecimiento basadas en la masa específica de las larvas.

	Tamaño I	Tamaño II	Duración	Crecimiento
TC	H_2 = 0,19 χ^2 = 1,14 P = 0,286	H_2 = 0,24 χ^2 = 1,38 P = 0,24	H_2 =0,42 χ^2 = 3,30 P =0,069	H_2 = 0,01 χ^2 = 0,005 P = 0,944
tC	H_2 = 0,03 χ^2 = 0,06 P = 0,806	**H_2 = 0,94** χ^2 = 21,35 P = 0,000004	**H_2 = 0,87** χ^2 = 17,55 P = 0,00003	H_2 = 0,30 χ^2 = 2,77 P = 0,096
tc	H_2 = 0,05 χ^2 = 0,19 P =0,659	**H_2 = 0,49** χ^2 = 6,10 P = 0,0134	**H_2 = 0,80** χ^2 = 13,64 P = 0,0002	H_2 = 0,16 χ^2 = 0,95 P = 0,331

La varianza de los rasgos metamórficos en los tratamientos tc y tC viene determinada por la pertenencia a una u otra familia, como se puede ver con la estima de la heredabilidad en sentido amplio de la fecha y del tamaño en la metamorfosis (después de controlar el efecto del tamaño inicial de las larvas) (Tabla 3). En el tratamiento TC, por el contrario, no encontramos ninguna varianza genética en las respuestas. Tampoco encontramos en ninguno de los tres ambientes ningún componente de varianza genética para las tasas de crecimiento basadas en el tamaño específico. En todos ellos también observamos que la duración del periodo larvario y el tamaño de las larvas al metamorfosearse están correlacionados positivamente tanto genética como fenotípicamente (Tabla 5, Fig. 3).

Con el análisis de paralelismo de las curvas de crecimiento que llevamos a cabo, se pone de manifiesto que las líneas de regresión no son paralelas ($F_{2,141}$ = 20,96; P<0,001). La pendiente de la curva del tratamiento tc es diferente a la de los otros dos

Tabla 4: Tabla resumen del test de MANOVA con repeticíon con el que se analiza el crecimiento de las larvas con respecto a los factores "Familia", "Tiempo" y la interacción "Familia" x "Tiempo".

MANOVA

Fuente de variación	λ de Wilk	R de Rao	gl 1, gl 2	P
Trat. TC (hasta semana 10)				
Familia	0.262	2.064	24, 105	0.0064
Tiempo	0.116	527.271	5, 31	<0.00001
Familia x Tiempo	0.491	1.239	20, 103	0.239
Trat. tC (hasta semana 14)				
Familia	0.292	2.328	28, 160	0.0005
Tiempo	0.017	442.305	6, 54	<0.00001
Familia x Tiempo	0.628	0.941	24, 158	0.548
Trat. Tc (hasta semana 16)				
Familia	0.272	1.662	36, 144	0.019
Tiempo	0.021	228.563	8, 39	<0.00001
Familia x Tiempo	0.383	1.347	32, 145	0.121

Fig. 3: Covariación de la duración del periodo larvario (en días) y el peso de las larvas al metamorfosearse (en gramos) en los tres tratamientos.

tratamientos. Las pendientes de TC y tC no difieren significativamente ($F_{1,90}$ = 0,71; P = 0,40); sólo muestran una ligera diferencia en su elevación (efecto de tratamiento $F_{1.91}$ = 5,01; P = 0,027), que puede ser explicada por sus diferencias en tasas de crecimiento. Las correlaciones de los rasgos metamórficos entre ambientes sólo fueron significativas para el tamaño en la metamorfosis en los tratamientos que difieren en cantidad de comida a baja temperatura (tc y tC). Las diferencias en tasas de crecimiento basadas en la masa específica y la duración del periodo larvario también fueron significativas pero marginalmente después de aplicar una corrección de Bonferroni (Tabla 6).

Plasticidad de los rasgos metamórficos en condiciones de variación de alimentación y temperatura

Como podemos ver en la Tabla 7, después de controlar el efecto del peso al nacer de las larvas y a través de un análisis de MANCOVA se observa que las respuestas de la duración del periodo larvario y el crecimiento basado en el tamaño específico se ven afectadas por el factor "familia", el factor "tratamiento" y por la interacción "familia" x "tratamiento". En la Tabla 8, están representados los resultados unifactoriales obtenidos con

Tabla 5: Correlaciones fenotípicas y genéticas (métodos de REML y "Medias Familiares", con las correspondientes probabilidades asociadas) entre el tamaño de las larvas en la metamorfosis y la duración del periodo larvario.

Tratamientos	REML	Media Familiar	Fenotípica
TC	0.964 χ^2 = 59.63 ***	0.897 *	0.916 *** (N = 39)
tC	0.951 χ^2 = 41.25 ***	0.912 *	0.814 *** (N = 55)
tc	1.002 χ^2 = 37.24 ***	0.956 *	0.763 *** (N = 53)

Tabla 6: Correlaciones genéticas, entre los diferentes ambientes, la duración del periodo larvario, del tamaño de las larvas en la metamorfosis y en el crecimiento basado en la masa específica de las larvas.

	tC	tc
Duración		
TC	0,289 (ns)	0,429 (ns)
tC		0,816 (0.09)
Tamaño		
TC	0,758 (ns)	0,576 (ns)
tC		0,959 (**0,01**)
Crecimiento		
TC	0,523 (0,36)	0,385 (0,55)
tC		0,892 (0,04)

un modelo mixto de ANOVA de dos vías (Variable independiente continua: Tamaño de las larvas al nacer; Variables dependientes: duración del periodo larvario, tamaño al metamorfosearse y crecimiento) donde se observa que los rasgos metamórficos se ven influenciados por la identidad materna y por los dos gradientes ambientales creados (comida y temperatura). En el gradiente de comida (tratamientos tC y tc), la variación de la cantidad de comida afecta claramente al crecimiento, al tamaño de las larvas al metamorfosearse y a la duración del periodo larvario. El factor familia (siempre dentro de este gradiente de comida) también influye en estos dos últimos rasgos pero no así sobre el crecimiento. Sin embargo, la interacción "familia" x "comida" no influye significativamente sobre ninguno de los rasgos metamórficos a excepción de una interacción marginal con la duración del periodo larvario (Tabla 8, Fig. 4). En lo que se refiere al gradiente de temperatura, se observa que las diferencias de temperaturas afectan únicamente al crecimiento basado en el tamaño específico, pero no así al resto de rasgos metamórficos. A temperaturas más altas no se incrementan el periodo de desarrollo de las larvas, como tampoco se incrementan las tasas de crecimiento basada en la masa específica. Este hecho, unido a las tasas de mortalidad más elevadas en los tratamientos TC y Tc, sugiere que la temperatura alta puede ser considerado como un factor de estrés que afecta directamente al desarrollo larvario, o que la cantidad de comida que se suministró a las

Tabla 7: Respuestas de la duración del periodo larvario y del crecimiento a los factores "familia", "ambiente" y "familia x ambiente", según un análisis de MANCOVA. **gl**: grados de libertad.

	MANCOVA			
Fuente de variación	**λ de Wilk**	**R de Rao**	**gl 1, gl 2**	**P**
Familia	0.669	4.369	12, 320	<0.000001
Ambiente	0.101	86.842	6, 242	<0.000001
Familia x Ambiente	0.697	1.942	24, 351	0.006
Ln Tamaño Nacimiento	0.022	1809.38	3, 121	<0.000001

Tabla 8: Resumen del análisis del modelo mixto de ANCOVA de dos vías analizando las respuestas de las larvas a los cambios de temperatura y cantidad de comida. **Factores**: duración del periodo larvario, tamaño en la metamorfosis y tasas de crecimiento basadas en la masa específica de las larvas; **Variable independiente continua**: tamaño de las larvas al nacer; $\mathbf{MS_N}$; cuadrado medio del numerador; $\mathbf{MS_D}$: cuadrado medio del denominador.

	ANCOVA											
	FECHA				TAMAÑO				CRECIMIENTO			
Fuente de variación	**MSN**	**MSD**	**F**	**P**	**MSN**	**MSD**	**F**	**P**	**MSN**	**MSD**	**F**	**P**
Gradiente Comida (tC vs tc)												
Familia	0.127	0.018	7.259	**0.032**	0.292	0.013	22.087	**0.0016**	1.479	1.462	1.011	0.492
Ambiente	4.365	0.018	246.14	**0.0001**	1.364	0.013	103.84	**0.0001**	418.1	1.484	281.68	**0.0001**
Familia x Ambiente	0.018	0.009	2.009	0.099	0.012	0.017	0.755	0.552	0.609	0.369	1.65	0.168
Ln Tamaño Nacimiento	0.182	0.009	20.26	0.0001	0.0003	0.017	0.002	0.962	11.251	0.369	33.86	0.0001
Error	0.009				0.017				0.369			
Gradiente Temperatura (TC vs tC)												
Familia	0.180	0.065	2.755	0.163	0.490	0.064	7.704	**0.028**	1.329	1.672	0.795	0.582
Ambiente	0.381	0.066	5.794	0.069	0.147	0.064	2.307	0.196	1.424	1.686	8.441	**0.041**
Familia x Ambiente	0.067	0.041	1.654	0.169	0.064	0.059	1.091	0.367	1.742	0.737	2.363	0.061
Ln Tamaño Nacimiento	0.071	0.041	1.749	0.189	0.006	0.006	0.099	0.753	25.091	0.737	34.04	0.0001
Error	0.041				0.006				0.737			

larvas no fue suficiente para cubrir la demanda energética para mantener el crecimiento (Zakrzewski, 1987). El factor "familia" también influye sobre el tamaño de las larvas al metamorfosearse. La interacción "familia" x "temperatura" sólo fue significativa (aunque marginalmente) para el crecimiento.

Tamaño de las madres y tamaño de los huevos

Por último, en la Tabla 9, reflejamos la relación entre el tamaño de los huevos de las hembras ovovivíparas y vivíparas. En estos datos se advierten ciertas tendencias (Fig. 5) que, aunque no podamos confirmarlas estadísticamente, sí nos parece interesante mencionarlas.

Tanto las hembras ovovivíparas como las vivíparas mantienen la misma relación negativa entre su tamaño y el número de huevos; las hembras más grandes contienen menos huevos (Fig. 5A). Esta misma relación negativa se observa entre el número de huevos y el tamaño de éstos; cuantos menos huevos hay, son más grandes (Fig. 5B). Las hembras más grandes, por tanto, tienen menos huevos, pero más grandes (Fig. 5C). En nuestro caso, la relación negativa entre tamaño de la hembra y número de huevos es claramente apreciable tanto para hembras ovovivíparas como vivíparas, aunque en las primeras la tendencia parece más acusada. Asimismo, las hembras ovovivíparas y vivíparas presentan tamaños de huevos similares (Fig. 5C). Además, como se observa en las Fig. 5D y 5E en las que hemos estimado el volumen total de vitelo que cada hembra ha generado en sus huevos, se puede pensar que las hembras vivíparas invierten en proporción más vitelo en sus huevos que las hembras ovovivíparas. En la Fig. 5D se relacionan los milímetros cúbicos de vitelo con la longitud cabeza-cloaca. Las hembras vivíparas y ovovivíparas siguen tendencias opuestas. Aunque esto pueda ser un efecto del escaso número de muestra, lo que sí se observa es una similitud en los valores del volumen, no relacionado con el aumento de talla: las salamandras vivíparas generan aproximadamente tanto vitelo como las ovovivíparas, a pesar de ser más pequeñas. En la Fig.

Fig. 4: Normas de Reacción de las cinco familias de larvas. Duración del periodo larvario en días; peso de las larvas al metamorfosearse en gramos; tasas de crecimiento basadas en la masa específica de las larvas.

Tabla 9: **Mij**: Hembras ovovivíparas de Mijares (*S. s. bejarae*); **Ov**: hembras vivíparas de Oviedo (*S. s. bernardezi*); **SVL**: longitud cabeza-cloaca (en cm); **LT**: longitud total (en cm); **Nº de Huevos**: número de huevos por hembras; **mm³**: milímetros cúbicos de vitelo estimados en cada hembra; **Tamaño**: tamaño medio de los huevos.

	SVL	LT	Nº Huevos	mm3 est.	Tamaño	mm3/SVL	mm3/Nº H.
Mij-11	10.5	17.1	42	1774.3	4.321	169	42.24
Mij-12	9.53	16.25	54	2411.6	4.402	253	44.66
Mij-13	8.93	15.27	60	1985.6	3.983	222	33.09
Ov-9	6.37	11.92	85	1971.8	3.538	309.5	23.2
Ov-10	7.9	14.06	50	2041.4	4.272	258	40.83
Ov-12	7.61	12.92	75	2444.6	3.964	321	35.59

5E, comparamos el "esfuerzo reproductor" en ambas estrategias a partir de la relación entre el volumen de vitelo y la talla de la hembra: como decíamos anteriormente, parece que las hembras vivíparas invierten más vitelo en sus huevos que las hembras ovovivíparas.

4. Discusión

Abundan los estudios en los que se analiza la evolución de las características vitales de los organismos ('life-history traits') y su relación con la adaptación y diversificación de las especies. Para explicar como han evolucionado las diferentes estrategias vitales observadas, se ha empleado tradicionalmente las técnicas o conceptos de optimación, que se sustentan, fundamentalmente, en el paradigma adaptacionista neodarwinista (Stearns, 1992; 2000). Esto es muy aparente en los modelos planteados para los anfibios, sobre todo en lo que se refiere a las diferentes estrategias de reparto o de inversión materna en la reproducción ("reproductive allocation"). En estos modelos, se suele asumir que la inversión materna está directa y positivamente relacionada con la adecuación biológica de la descendencia. Sin embargo, en la actualidad y gracias a la gran cantidad de datos empíricos disponibles, estos modelos están siendo revisados bajo un prisma un tanto distinto, haciendo énfasis en los patrones de respuesta fenotípica de los genotipos, o, lo que es lo mismo, en las normas de reacción y la plasticidad fenotípica tanto de las respuestas de las hembras como las de la progenie, así como en otros aspectos antes menos estudiados como la naturaleza y la influencia de los efectos maternos durante el desarrollo (Kaplan, 1998; Schlichting & Pigliucci, 1998).

Un ejemplo claro de este cambio de perspectiva, se encuentra en los nuevos trabajos sobre anfibios que estudian la relación entre la inversión materna en la progenie, el tamaño de las larvas y su adecuación biológica (Kaplan, 1991; 1998). En muchas especies de anfibios, sobre todo cuando no existe cuidado parental, la inversión materna en su descendencia se reduce al aprovisionamiento de materia y energía en los huevos. Cuando la madre hace esta inversión no puede predecir el ambiente en el que su progenie va a desarrollarse, por lo que las variaciones del tamaño de los huevos producidos vienen siendo interpretadas como apuestas o estrategias de las madres para optimizar el

Fig. 5: Relación entre el tamaño de los huevos y el tamaño de las hembras vivíparas y ovovivíparas. **En verde**: salamandras de Oviedo (vivíparas); **en rojo**: salamandras de Mijares (ovovivíparas); **N°**: número de huevos por hembra; **SVL**: longitud cabeza-cloaca (en cm); **M**: Tamaño medio de los huevos (en mm); **mm³**: milímetros cúbicos de vitelo estimados en cada hembra; **estrategia**: 1-ovoviviparismo, 2-viviparismo.

coste de la reproducción (Kaplan, 1991). Bajo este punto de vista, se tendía a definir el tamaño de huevo óptimo en función de los costes energéticos de la producción y la adecuación biológica de la progenie. Más recientemente, sin embargo, el centro de interés de los estudios ha pasado a ser la optimación de la variabilidad de los tamaños; la plasticidad del sistema de producción materno, la plasticidad del sistema de desarrollo de la progenie, así como los efectos maternos, son los parámetros que hoy en día pueden ana-

lizarse como factores de evolución de las estrategias vitales (KAPLAN, 1998). Más que intentar definir fenotipos óptimos perfectamente adaptados gracias al poder maximizante de la selección natural, se tiende a sondear el potencial evolutivo de un sistema a partir de características como su plasticidad fenotípica o los compromisos (trade-offs) durante el desarrollo. Podemos enmarcar, en este contexto, el análisis que hemos llevado a cabo sobre la influencia del ambiente, concretamente de dos factores como la temperatura del medio y la cantidad de nutrientes, en el desarrollo de las larvas de las *Salamandra salamandra*.

Según los resultados que hemos obtenido en este capítulo, el tamaño de las larvas de *Salamandra salamandra* al nacer influye claramente sobre caracteres que están directamente relacionados con su adecuación biológica (fitness), como pueden ser la tasa de supervivencia de las larvas, los tamaños de las larvas al metamorfosearse o sus tasas de crecimiento. Hay que destacar que la importancia de esta influencia depende en gran medida del ambiente en el que se desarrollaron las larvas. Así por ejemplo, en el ambiente tc, tratamiento en el que las larvas experimentaron un crecimiento más lento, la influencia del peso inicial perduró durante más tiempo que en el resto de ambientes, afectando incluso al tamaño de las larvas al metamorfosearse. Se desconoce cuáles son los factores causantes de la variación en el peso de las larvas al nacer, aunque seguro que incluyen en mayor o menor medida algún tipo de determinación genética. Se ha comprobado por ejemplo que la variación del tamaño de las larvas al eclosionar en tres especies de anuros puede atribuirse a la variación genética no aditiva (TEJEDO & SÁNCHEZ HERRÁIZ, comuninación personal; SEMLITSCH & SCHMIEDEHAUSEN, 1994; TRAVIS *et al*., 1987). Aquí, sin embargo, asumimos que la variación de los tamaños de las larvas al nacer (o al menos parte de esta variación) puede estar inducida directamente por los genes maternos o bien por el ambiente experimentado por la madre; asumimos por tanto que la variabilidad es consecuencia o está relacionada con un efecto materno. Esto, además, ha sido puesto en evidencia por otros autores como THIESMEIER (1990) o WARBURG (1997), al demostrar que las hembras más grandes de *Salamandra salamandra* ponen también larvas más grandes.

La variabilidad del tamaño medio de las larvas al nacer entre las familias se mantiene durante casi todo el desarrollo larvario. El hecho de que no exista en ninguno de los tratamientos una interacción de los factores "familia" x "tiempo" indica como hemos dicho anteriormente que las trayectorias de crecimiento son muy similares entre las familias; la variabilidad inicial condiciona la elevación de las curvas de crecimiento. Al ser éstas paralelas las diferencias iniciales de tamaño se mantienen. Este es un hecho relevante ya que el tamaño de las larvas es un rasgo sujeto potencialmente a una fuerte presión selectiva, tanto por las consecuencias sobre la adecuación biológica del adulto, como durante la vida de las larvas. Los ataques y agresiones entre larvas son frecuentes (sobre todo en charcas con densidades altas de individuos) tanto en *Salamandra salamandra* (DEGANI *et al*., 1980; THIESMEIER, 1992) como en otras especies de salamandras (KUSANO *et al*., 1985; MARET & COLLINS, 1994), situaciones en las que las larvas más pequeñas son más susceptibles de ser atacadas que las más grandes (REQUES & TEJEDO, 1996).

La influencia de los efectos maternos tiende a ser mayor durante el inicio del desarrollo, durante las primeras semanas de vida larvaria, decayendo poco a poco a medida que las larvas van creciendo (como se aprecia en la correlación negativa entre los valores de los tamaños iniciales y los tamaños de las larvas durante el desarrollo). En el tratamiento TC, los efectos maternos desaparecen después de las sexta semana de crecimiento; en cambio, en los tratamientos con baja temperatura se mantienen hasta la metamorfosis, aunque disminuyendo en intensidad. Este mismo patrón de declive de los efectos maternos durante el desarrollo se ha visto en otras especies de anfibios y aunque en algunas de ellas no parece que tengan una influencia clara sobre algún rasgo metamórfico (Semlitsch & Gibbons, 1990; Tejedo & Reques, 1992; Travis *et al.*, 1987), en otras sí (Parichy & Kaplan, 1992; Semlitsch & Schmiedehausen, 1994). La influencia de los efectos maternos sobre el desarrollo será más importante en especies con un desarrollo larvario más corto o potencialmente variable que en especies con periodos larvarios más prolongados (Semlitsch & Gibbons, 1990). En nuestro estudio, la duración del periodo larvario fue menor en larvas con un tamaño inicial mayor. Asimismo, el tamaño en la metamorfosis está correlacionado positivamente (tanto genética como fenotípicamente) con el tamaño inicial en el tratamiento tc. Por tanto, podemos decir que la evolución del tamaño de las larvas al metamorfosearse en los ambientes con temperaturas bajas está ligada a la del tamaño de las larvas al nacer (asumiendo que la variabilidad de ambos rasgos tenga, al menos parcialmente, un origen genético).

En ningún tratamiento se observó que los tamaños larvarios variaran entre las familias después de la semana diez de crecimiento (eliminando la variabilidad debido a las diferencias de tamaño inicial), lo que puede estar indicando que, al inicio del desarrollo, la variabilidad depende más del aporte materno que de una variación genética intrínseca. Esta situación se altera en el momento de la metamorfosis: en los tratamientos con baja temperatura las estimas de heredabilidad de la duración del periodo larvario y del tamaño al metamorfosearse dan valores estadísticamente significativos; existe, entonces, cierto componente genético responsable de la variabilidad que se observa en la metamorfosis. Asimismo, en el tratamiento TC, encontramos un cierto componente (residual, pero significativo) de varianza genética en el tamaño de las larvas en la metamorfosis. Hay, por tanto, un cambio en los factores que contribuyen al desarrollo de las larvas: se pasa del control del desarrollo fenotípico por factores maternos al control del desarrollo por el genotipo larvario. Este patrón es bastante común en la naturaleza, teniendo los efectos maternos más influencia en los estadios más tempranos del desarrollo y desapareciendo poco a poco (Kearsey & Pooni, 1996; aunque, por el contrario, Holtmeier (2001) describe la influencia tardía en el desarrollo de los efectos maternos sobre la ontogenia de un grupo de especies de *Cyprinodon*).

Hemos encontrado una covariación muy significativa entre el tamaño de metamorfosis y la duración del periodo larvario, covariación tanto fenotípica como genética. A estos mismos resultados llegan Semlitsch & Gibbons (1990) en *Ambystoma talpoideum* o Kopp & Baur (2000) en una población de *S. s. terrestris*. Estos dos rasgos no pueden variar, ni seguramente evolucionar, independientemente. Para metamorfosearse con un

tamaño mayor las larvas tienen que haber experimentado un desarrollo más lento. Este resultado se ve apoyado por el hecho de que las tasas de crecimiento basadas en el tamaño específico no difieren entre las familias, además de por el paralelismo de las trayectorias de crecimiento. Hemos encontrado suficiente varianza genética (heredabilidad en sentido amplio, incluyendo efectos de dominancia y aditivos) tanto en el tamaño de las larvas en la metamorfosis como en la duración del periodo larvario, lo que nos puede indicar que estos rasgos no se están encauzando, por selección natural, hacia un valor fenotípico determinado. Como comentábamos en la introducción de este capítulo, las salamandras en la población de Mijares realizan sus puestas en arroyos y cursos de agua que pueden llegar a helarse en invierno y a secarse en verano, lo que puede acarrear una tasa de mortalidad alta y una fuerte presión selectiva. Podríamos estar ante un escenario en el que fuese más provechoso metamorfosearse rápidamente, para evitar en lo posible los riesgos de congelación y desecación, dependiendo del momento de la puesta. Eso sí, un desarrollo más rápido implicaría un tamaño menor al metamorfosearse, lo que está directamente relacionado con la adecuación biológica de los juveniles terrestres (Newman & Dunham, 1994) y con la edad y el tamaño con el que los individuos alcanzarán la madurez sexual (Berven, 1990; Semlitsch *et al*., 1988). Los individuos con tasas de crecimiento más lentas se metamorfosearán con un tamaño mayor y posteriormente alcanzarán la madurez sexual antes. Este mismo compromiso entre las tasas de crecimiento, la duración del periodo larvario y el tamaño de los metamórficos ha sido puesto en evidencia en poblaciones suizas de *S. s. terrestris* (Kopp & Baur, 2000), a pesar de las diferencias taxonómicas y geográficas entre ambos grupos de poblaciones. La existencia de esta pleiotropía antagonista en rasgos directamente relacionados con la adecuación biológica (como la talla y la duración del periodo larvario) puede ser considerada como una restricción ("constraint") para la evolución de los fenotipos a causa de las posibles respuestas opuestas frente a una misma presión selectiva (Lande, 1979). Aún así, éste es un patrón que se repite con bastante frecuencia, sobre todo en la relación talla en la metamorfosis y tasas de diferenciación en anfibios (Berven, 1987; Blouin, 1992a; Newman, 1988; Newman, 1994; Richardson, 2001; Semlitsch, 1993; Travis *et al*., 1987; aunque ver Tejedo & Reques, 1992). Se ha propuesto como hipótesis que el antagonismo en los rasgos relacionados con la adecuación biológica juega precisamente un papel importante en el mantenimiento de los polimorfismos y la diversidad genética (Rose, 1982; aunque ver también Cutsinger *et al*., 1994). Ahora bien, también es posible que el supuesto compromiso ("trade-off") entre ambos rasgos no sea tal y que la variabilidad en tamaño de las larvas al metamorfosearse pueda ser simplemente una consecuencia inevitable de la variabilidad de la duración del periodo larvario (Blouin, 1992b).

El análisis de las normas de reacción de las diferentes familias revela la ausencia de cualquier interacción significativa "familia" x "tratamiento" para todos los rasgos metamórficos. Esta interacción, recordemos, nos indicaría la existencia de variabilidad genética en la expresión de la plasticidad fenotípica de los rasgos metamórficos. Por otro lado, la correlación genética (medias familiares) del tamaño de las larvas al metamorfosearse también nos está indicando que existe cierta dependencia entre los valores que alcanzan

las larvas en los ambientes que difieren en cantidad de comida (el gradiente de comida). El potencial evolutivo de una norma de reacción depende, necesariamente, de la variabilidad genética disponible entre los diferentes ambientes, así como del grado de independencia de los diferentes valores o estados que toma un rasgo o carácter en los diferentes ambientes. Además, también es necesario que no exista ningún tipo de "compromiso genético" ("genetic trade-off") del rasgo que estamos analizando con otros que estén directamente relacionados con la adecuación biológica del individuo (Via & Lande, 1985). Como hemos visto, existe cierta variabilidad genética en los diferentes ambientes para el tamaño en la metamorfosis. Sin embargo, el hecho de que exista esta dependencia entre los valores que pueden alcanzar las larvas y la existencia de cierto "compromiso genético" entre el tamaño y la duración del periodo larvario pueden reducir el potencial evolutivo de la norma de reacción del tamaño de las larvas al metamorfosearse en ambientes que difieren en recursos alimentarios.

En un ambiente como el de la población de Mijares, en el que las larvas pueden sufrir una fuerte presión selectiva causada por la climatología, el tener un sistema ontogénico fenotípicamente plástico con un marcado componente genético puede llegar a ser una ventaja adaptativa muy grande, presentando, entonces, un potencial evolutivo claro. Sin embargo, este no es el caso, como hemos podido ver. En su lugar, la variabilidad observada en respuesta a las diferencias de temperatura y cantidad de comida vienen condicionadas básicamente por un efecto materno, el tamaño de las larvas al nacer, además de cierto componente genético propio de cada larva. Los efectos maternos inducidos por las hembras de *Salamandra salamandra* a través del tamaño de las larvas al nacer se mantienen durante parte del desarrollo, afectando a la supervivencia de las larvas así como a otros rasgos metamórficos relacionados con su adecuación biológica. Estos efectos maternos llegan incluso a condicionar el tamaño de las larvas en la metamorfosis y la duración del periodo larvario en ambientes con temperaturas bajas. Si consideramos que el tamaño de las larvas en el momento de su nacimiento está determinado por factores maternos heredados y no está directamente relacionado con los genotipos de las larvas, entonces este efecto materno puede llegar a ser adaptativo. Para ello, los efectos maternos deben tener una base genética y no ser simplemente inducidos por el ambiente. A pesar de haber constatado experimentalmente la importancia de los efectos maternos en muchos organismos aún no se conoce con detalle cuáles son sus mecanismos de acción. Mientras que se conocen las claves ambientales que estimulan los efectos maternos y las modificaciones fenotípicas a las que dan lugar, no se tiene una idea clara de los mecanismos fisiológicos y del desarrollo por los que se transmiten de los progenitores a la progenie, de generación en generación (Kaplan, 1998; Shaw & Byers, 1998).

Como hemos visto, el desarrollo de los embriones ovovivíparos, desde la fecundación hasta la eclosión, ocurre dentro de los úteros maternos. Los embriones crecen, por tanto, en una ambiente con una temperatura constante y su desarrollo se sustenta exclusivamente en la reserva vitelina del huevo. Después de la eclosión, se inicia la etapa larvaria acuática, etapa cuya duración variará en función de factores como el tamaño inicial

de la larva, la temperatura del agua o la cantidad de nutrientes disponible. Los efectos maternos, reflejados en el tamaño inicial de las larvas, tienen cierta influencia sobre el desarrollo larvario si éste no se prolonga demasiado, aunque a temperaturas más bajas la influencia puede prolongarse hasta la metamorfosis. Las tasas de crecimiento no varían entre familias, no hay diferencias genéticas en ese aspecto, como tampoco las hay en la plasticidad fenotípica de los rasgos metamórficos analizados; las variaciones observadas se pueden achacar a las condiciones ambientales y a los efectos maternos iniciales, pero no existe variabilidad genética en las respuestas fenotípicas en los diferentes ambientes.

Por lo general, las conclusiones que se sacan en este tipo de análisis son difícilmente extrapolables al conjunto de poblaciones de una especie por las diferencias geográficas y climáticas de su área de distribución. Kopp & Baur (2000), sin embargo, obtienen en algunos aspectos unos resultados similares en una población suiza de la subespecie *S. s. terrestris*, por lo que podríamos pensar que constituyen características propias de *S. salamandra*. ¿Podríamos relacionar estos datos con el viviparismo en *S. s. bernardezi*?

Como veíamos en el capítulo anterior, el desarrollo completo de los individuos de esta subespecie ocurre dentro de los úteros maternos, donde, como en el caso anterior, se mantienen una temperatura constante. Desde la fecundación hasta la eclosión, los embriones vivíparos se nutren exclusivamente del vitelo del huevo. Las condiciones son muy similares a las del desarrollo ovovivíparo pero, sin embargo, además de los fenómenos de heterocronía descritos, se produce una aceleración general del desarrollo causada por unas tasas de desarrollo mucho más altas en los embriones vivíparos. Dado que en estos estadios de desarrollo no hay un aporte extra de nutrientes además de las reservas vitelinas del huevo, podemos asociar estas diferencias a dos factores, básicamente: un componente genético o un efecto materno. Hemos asumido en este capítulo que el tamaño de las larvas al nacer puede ser considerado como un efecto materno. El tamaño de las larvas está directamente relacionado con el tamaño del huevo, o sea, con la cantidad de vitelo que contiene el huevo. El tamaño de las larvas dependerá por tanto en gran medida de la "inversión" energética que haga la madre en sus huevos. Intuitivamente, se puede pensar que debe existir un cierto equilibrio o compromiso entre el tamaño de las hembras, el número de huevos que pueden producir, el tamaño de estos huevos y el tamaño final de las larvas. En la Tabla 9 y en la Fig. 5, mostrábamos la relación entre el número y el tamaño de los huevos y el tamaño de las hembras de salamandra. Como veíamos, las hembras más grandes generan menos huevos, siendo éstos más grandes. Esta relación es relativamente frecuente en anfibios (y otros organismos). Cummins (1986), propone que el compromiso entre el tamaño de la puesta y el tamaño de los huevos en *Rana temporaria* es un compromiso puramente fisiológico: cuantos más huevos, más pequeños, ya que habrá menos material energético disponible para su fabricación. Aunque Tejedo (1992), analizando puestas del sapo *Bufo calamita*, contradice esta idea, sugiriendo que cuanto más grandes son las hembras más fácil les resulta hacer más huevos y más grandes, ya que consiguen romper este compromiso. Las hembras vivíparas generan, si se confirman las tendencias que hemos señalado, un número de huevos mayor que las ovovivíparas, aunque éstos son ligeramente menores. La aceleración

observada durante el inicio del desarrollo de los embriones vivíparos no parece, entonces, relacionada con un efecto maternos reflejado en el tamaño de los huevos.

Después de la eclosión, las larvas vivíparas se alimentan activamente. El desgaste temprano de su reserva vitelina causado por un metabolismo más activo (tasas de desarrollo más altas) se compensa con el aporte extra de nutrientes provenientes de la ingesta de huevos abortivos. Este alimento suplementario, junto a la temperatura constante, permite el acortamiento de la duración del periodo larvario. Las larvas vivíparas se metamorfosearán en un tiempo menor y con un tamaño también menor, aunque el tamaño de los metamórficos vivíparos entra dentro del rango inferior de la variación en tamaños que muestran los metamórficos ovovivíparos (Salvador & García-París, 2001; Thiesmeier *et al.*, 1994; observaciones personales).

Aunque, obviamente, las conclusiones que podamos extrapolar de nuestros resultados para las salamandras vivíparas son siempre tentativas, sí nos pueden ayudar a plantear hipótesis o predicciones potencialmente comprobables, como por ejemplo las cuatro siguientes.

1- Existe una mayor variabilidad genética en las tasas de desarrollo de los embriones vivíparos, que se ve reflejada en la asincronía de su desarrollo dentro de una misma madre.

2- Dado que el desarrollo transcurre en un medio estable y tiene una duración relativamente corta, la influencia de los posibles efectos maternos perdurará durante casi todo el desarrollo, llegando hasta la metamorfosis.

3- Existe el mismo compromiso entre tamaño en la metamorfosis y duración del periodo larvario entre individuos ovovivíparos y vivíparos.

4- Los metamórficos vivíparos, aunque pequeños, entran dentro del rango de variabilidad en tamaños que presentan los ovovivíparos. Los adultos vivíparos, sin embargo, alcanzan unos tamaños significativamente menores que los ovovivíparos como consecuencia de unas tasas de crecimiento postmetamórficas más lentas (Alcobendas & Castanet, 2000). Podemos plantear que en la estrategia vivípara, la tasa de diferenciación más alta junto a la tasa de crecimiento más baja de los embriones durante el desarrollo temprano condicionan o delimitan las tasa de crecimiento durante el desarrollo adulto del individuo.

La continuación de esta línea de trabajo nos permitirá completar el dibujo de la diversificación de las estrategias reproductoras en *Salamandra salamandra*.

Apéndice

Apéndice 1. Datos recopilados para cada individuo durante el experimento. **T° 1**: temperatura baja; **T° 2**: temperatura alta; **C 1**: mucha comida; **C 2**: poca comida; **Peso 0**: peso en el nacimiento; **Peso 1**: peso al salir del agua; **Peso 2**: peso al completar la metamorfosis; **Long 0**: longitud en el nacimiento ; **Long. 1**: longitud al salir del agua; **Long. 2**: longitud al completar la metamorfosis; **Tiemp. 0**: salida del agua de las larvas; **Tiemp. 1**: metamomorfosis completada; **Tiemp. 2**:T1 – T0; (pesos en gramos, longitudes en milímetros, duraciones en días).

Indi.	Madre	T°	Comida	Peso 0	Long. 0	Peso 1	Long. 1	Peso 2	Long.2	Tiemp.0	Tiemp.1	Tiemp.2
1_1	1	1	1	0,167	30	0,73	49	0,547	48	101	122	21
1_2	1	1	1	0,19	30	0,68	48	0,541	48	101	114	13
1_3	1	1	1	0,173	30	0,819	49	0,671	51	111	122	11
1_4	1	1	1	0,16	30	0,787	50	0,664	50	118	133	15
1_5	1	1	1	0,106	25	0,581	46	0,554	46	138	154	16
1_6	1	1	1	0,165	30	0,783	50	0,638	49	120	129	9
1_7	1	1	1	0,165	29	0,745	49	0,657	49	125	141	16
1_8	1	1	1	0,169	30	0,75	51	0,694	50	111	127	16
1_9	1	1	1	0,121	26	0,719	49	0,662	49	142	154	12
1_10	1	1	1	0,179	31	0,769	50	0,579	49	105	125	20
1_11	1	1	1	0,166	30	0,841	52	0,705	51	111	127	16
1_12	1	1	1	0,181	32	0,752	50	0,612	50	104	122	18
1_0	1	1	2	0,131	27	0,574	46	0,435	43	204	247	33
1_13	1	1	2	0,191	32	0,648	48	0,471	45	163	182	19
1_14	1	1	2	0,174	31	0,585	47	0,442	45	177	189	12
1_15	1	1	2	0,167	29	0,728	49	0,581	47	230	243	13
1_16	1	1	2	0,168	29	0,647	47	0,504	46	189	211	22
1_17	1	1	2	0,159	30	0,665	48	0,495	47	185	201	16
1_18	1	1	2	0,189	31	0,814	53	0,668	51	226	238	12
1_19	1	1	2	0,156	29	0,545	45	0,433	42	177	189	12
1_20	1	1	2	0,163	30	0,62	47	0,514	46	185	196	11
1_21	1	1	2	0,186	30	0,697	49	0,537	47	196	211	15
1_22	1	1	2	0,146	29	0,57	46	0,437	46	188	201	13
1_23	1	1	2	0,107	25	0,73	50	0,538	48	280	301	21
1_24	1	2	1	0,178	31	1,086	58	0,914	56	203	211	8
1_25	1	2	1	0,128	27	1,048	58	0,985	56	185	196	11
1_26	1	2	1	0,118	27	0,521	46	0,485	46	109	114	5
1_27	1	2	1	0,16	28	0,82	51	0,765	50	163	175	12
1_28	1	2	1	0,159	27	1,093	56	0,966	56	193	210	17
1_29	1	2	1	0,158	29	1,011	59	0,881	58	210	222	12
1_30	1	2	1	0,123	28	0,995	56	0,888	54	180	196	16
1_31	1	2	1	0,164	31	0,677	50	0,542	49	126	132	6
1_34	1	2	1	0,164	29	0,547	45	0,521	45	108	114	6
1_35	1	2	1	0,174	31	1,488	68	1,189	67	268	280	12
1_32	1	2	2	0,113	26							
1_33	1	2	2	0,165	31							
1_36	1	2	2	0,181	31							
1_37	1	2	2	0,122	28							
1_38	1	2	2	0,162	31							
1_39	1	2	2	0,172	31							
1_40	1	2	2	0,171	31							
1_41	1	2	2	0,186	32							
1_43	1	2	2	0,144	30							
1_45	1	2	2	0,176	31							
1_46	1	2	2	0,15	29							
1_47	1	2	2	0,079	28							
2_1	2	1	1	0,188	31	0,595	45	0,499	45	98	111	13
2_2	2	1	1	0,178	32	0,604	46	0,461	45	101	114	13
2_3	2	1	1	0,167	31	0,668	48	0,49	47	101	114	13
2_4	2	1	1	0,163	31	0,65	47	0,508	47	101	111	10
2_5	2	1	1	0,187	32	0,575	45	0,506	46	98	104	6
2_6	2	1	1	0,166	30	0,706	48	0,544	48	104	125	21
2_7	2	1	1	0,18	33	0,729	49	0,575	49	101	119	18
2_8	2	1	1	0,167	31	0,563	45	0,459	44	109	127	18
2_9	2	1	1	0,181	31	0,61	46	0,511	46	101	108	7
2_10	2	1	1	0,143	31	0,656	49	0,499	48	98	124	16
2_11	2	1	2	0,197	32	0,657	47	0,47	45	163	175	12
2_12	2	1	2	0,19	33	0,503	44	0,391	42	163	182	19
2_13	2	1	2	0,155	29	0,503	43	0,433	42	203	211	8
2_14	2	1	2	0,193	31	0,604	45	0,455	43	163	175	12
2_15	2	1	2	0,176	31	0,444	42	0,381	40	139	154	15
2-!6	2	1	2	0,133	28	0,498	44	0,383	42	196	210	14
2_17	2	1	2	0,163	31	0,551	45	0,405	43	163	175	12
2_18	2	1	2	0,172	31	0,58	46	0,425	44	177	196	19
2_19	2	1	2	0,17	29	0,475	43	0,411	43	177	182	5

2_20	2	1	2	0,188	32	0,461	42	0,331	40	153	168	15
2_21	2	2	1	0,168	31	0,37	40	0,337	40	82	84	2
2_22	2	2	1	0,12	31	0,433	43	0,384	43	98	104	6
2_23	2	2	1	0,141	29	1,073	57	0,91	57	185	196	11
2_24	2	2	1	0,174	31	0,378	39	0,35	39	76	78	2
2_25	2	2	1	0,159	32	0,139	60	0,925	59	228	236	8
2_26	2	2	1	0,187	31	0,479	44	0,42	44	98	104	6
2_27	2	2	1	0,169	32	0,687	50	0,564	50	137	141	4
2_28	2	2	1	0,14	32	0,39	41	0,343	41	82	89	7
2_29	2	2	1	0,129	31	0,425	43	0,415	43	92	96	4
2_30	2	2	1	0,14	30	0,782	49	0,622	49	147	154	7
2_31	2	2	2	0,189	31							
2_32	2	2	2	0,181	31							
2_33	2	2	2	0,164	30							
2_34	2	2	2	0,184	31							
2_35	2	2	2	0,162	28							
2_37	2	2	2	0,178	31							
2_38	2	2	2	0,188	32							
2_39	2	2	2	0,176	31							
3_1	3	1	1	0,183	29	0,756	48	0,599	48	106	125	19
3_2	3	1	1	0,181	30	0,668	48	0,537	47	101	119	18
3_3	3	1	1	0,193	30	0,706	47	0,554	47	101	122	21
3_4	3	1	1	0,172	31	0,769	51	0,624	51	111	129	18
3_5	3	1	1	0,165	30	0,726	49	0,573	48	101	122	21
3_6	3	1	1	0,174	31	0,824	51	0,713	51	118	133	15
3_7	3	1	2	0,167	30	0,67	48	0,514	46	198	217	19
3_8	3	1	2	0,188	32	0,597	47	0,443	44	168	191	23
3_9	3	1	2	0,174	31	0,589	46	0,503	45	194	211	17
3_10	3	1	2	0,156	30	0,663	51	0,549	48	203	217	14
3_11	3	2	1	0,183	30	1,072	59	0,949	59	237	352	15
3_12	3	2	1	0,176	31							
3_13	3	2	1	0,148	30	0,648	48	0,496	47	116	125	9
3_14	3	2	1	0,157	31	0,417	42	0,392	42	82	84	2
3_15	3	2	1	0,162	30	0,482	43	0,427	43	108	114	6
3_16	3	2	2	0,169	31							
3_17	3	2	2	0,139	28							
3_18	3	2	2	0,17	30							
3_19	3	1	1	0,276	37	0,745	48	0,654	49	98	108	10
3_20	3	1	1	0,263	36	0,874	52	0,861	50	111	141	30
3_21	3	1	1	0,154	30	0,819	50	0,686	50	111	127	16
3_22	3	1	2	0,228	34	0,791	51	0,663	49	209	231	22
3_23	3	1	2	0,176	30	0,688	48	0,53	47	169	189	20
3_24	3	1	2	0,266	36	0,79	51	0,613	48	210	238	28
3_25	3	2	1	0,198	34	0,495	45	0,474	45	72	80	8
3_26	3	2	1	0,264	36	0,602	49	0,541	49	108	114	6
3_27	3	2	1	0,277	37	0,77	51	0,654	51	116	122	6
3_28	3	2	1	0,146	29	1,007	56	0,906	54	182	196	14
3_29	3	2	2	0,231	36							
3_30	3	2	2	0,247	36							
4_1	4	1	1	0,174	30	0,782	50	0,682	50	118	133	15
4_2	4	1	1	0,16	30	1,111	57	0,882	56	149	169	20
4_3	4	1	1	0,157	30	0,797	51	0,633	50	125	155	30
4_4	4	1	1	0,139	28	0,832	53	0,668	52	138	169	31
4_5	4	1	1	0,166	31	0,729	50	0,611	49	111	127	16
4_6	4	1	1	0,185	31	0,684	46	0,56	46	104	127	23
4_7	4	1	1	0,173	31	0,71	49	0,632	49	109	133	24
4_8	4	1	1	0,118	26	0,645	47	0,512	47	118	129	11
4_9	4	1	1	0,135	29	0,926	54	0,79	53	138	168	30
4_10	4	1	1	0,181	31	0,618	47	0,481	47	101	122	21
4_11	4	1	1	0,187	31							
4_12	4	1	1	0,17	32	0,89	53	0,788	52	126	154	28
4_13	4	1	1	0,147	25	0,75	47	0,598	45	128	140	12
4_0	4	1	2	0,179	31	0,624	49	0,484	47	198	211	13
4_14	4	1	2	0,156	29	0,661	48	0,501	46	203	223	20
4_15	4	1	2	0,152	30	0,664	49	0,524	47	210	238	28
4_16	4	1	2	0,182	32	0,678	50	0,52	48	219	242	23
4_17	4	1	2	0,156	30	0,677	48	0,516	46	196	211	15
4_18	4	1	2	0,151	30	0,624	47	0,46	45	204	231	27
4_19	4	1	2	0,169	29	0,662	46	0,499	44	204	236	32
4_20	4	1	2	0,171	31	0,665	49	0,509	47	208	238	30
4_21	4	1	2	0,169	28	0,541	42	0,375	40	166	189	23
4_22	4	1	2	0,177	30	0,665	50	0,506	47	204	223	19
4_23	4	1	2	0,161	30	0,565	44	0,4	43	168	184	16

4_24	4	1	2	0,192	30							
4_25	4	1	2	0,124	26	0,764	50	0,52	47	247	280	33
4_26	4	2	1	0,16	31							
4_27	4	2	1	0,154	30	0,564	48	0,53	48	109	119	10
4_28	4	2	1	0,156	31	1,165	60	1,062	60	232	243	11
4_29	4	2	1	0,189	32							
4_30	4	2	1	0,132	30							
4_31	4	2	1	0,154	31	1,058	58	0,948	59	228	243	15
4_32	4	2	1	0,158	31	0,661	49	0,595	49	123	133	10
4_33	4	2	1	0,163	32							
4_34	4	2	1	0,158	31							
4_35	4	2	1	0,126	28							
4_36	4	2	1	0,128	28	1,235	60	1,052	59	216	235	19
4_38	4	2	2	0,157	29							
4_39	4	2	2	0,156	31							
4_40	4	2	2	0,155	31							
4_41	4	2	2	0,173	31							
4_42	4	2	2	0,159	31							
4_43	4	2	2	0,12	28							
4_44	4	2	2	0,171	31							
4_45	4	2	2	0,163	31							
4_46	4	2	2	0,13	28							
4_47	4	2	2	0,136	29							
4_48	4	2	2	0,161	31							
5_1	5	1	1	0,125	27	0,739	50	0,565	49	108	125	17
5_2	5	1	1	0,137	28	0,58	45	0,45	45	101	111	10
5_3	5	1	1	0,119	27	0,588	47	0,524	45	111	127	16
5_4	5	1	1	0,129	28	0,672	46	0,5	46	101	111	10
5_5	5	1	1	0,133	27	0,607	47	0,549	45	111	125	14
5_6	5	1	1	0,132	27	0,51	42	0,389	42	101	111	10
5_7	5	1	1	0,135	28	0,659	48	0,478	47	105	122	17
5_8	5	1	1	0,1	25	0,56	48	0,533	47	112	127	15
5_9	5	1	1	0,135	28	0,683	47	0,506	46	110	127	17
5_10	5	1	1	0,134	28	0,582	46	0,517	46	101	108	7
5_11	5	1	1	0,137	28	0,676	48	0,559	48	111	125	14
5_12	5	1	1	0,13	28	0,644	48	0,544	48	114	127	13
5_13	5	1	2	0,135	27	0,427	43	0,354	41	196	211	15
5_14	5	1	2	0,129	26	0,597	45	0,46	43	210	230	20
5_15	5	1	2	0,132	27	0,448	41	0,306	39	170	189	19
5_16	5	1	2	0,125	28	0,5	44	0,425	42	184	196	12
5_17	5	1	2	0,121	25	0,542	44	0,395	42	185	196	11
5_18	5	1	2	0,121	28	0,456	42	0,348	42	177	189	12
5_19	5	1	2	0,143	28	0,69	49	0,494	47	274	301	27
5_20	5	1	2	0,129	28	0,479	45	0,362	42	194	211	17
5_21	5	1	2	0,13	28	0,561	46	0,392	44	163	182	19
5_22	5	1	2	0,132	28	0,56	45	0,43	45	187	201	14
5_23	5	1	2	0,127	28							
5_24	5	1	2	0,162	27	0,556	46	0,446	44	184	196	12
5_25	5	1	2	0,139	28	0,485	42	0,355	41	177	189	12
5_26	5	2	1	0,14	29	0,792	52	0,523	49	147	168	21
5_27	5	2	1	0,128	28							
5_28	5	2	1	0,119	27							
5_29	5	2	1	0,124	28	1,024	58	0,864	56	210	222	12
5_30	5	2	1	0,118	29	0,77	53	0,58	50	150	168	18
5_31	5	2	1	0,119	28							
5_32	5	2	1	0,118	29							
5_33	5	2	1	0,124	28							
5_34	5	2	1	0,129	29	0,53	47	0,503	46	108	114	6
5_35	5	2	1	0,094	26							
5_36	5	2	1	0,121	28	0,602	47	0,5	47	126	129	3
5_37	5	2	2	0,11	27							
5_38	5	2	2	0,124	28							
5_39	5	2	2	0,132	28							
5_40	5	2	2	0,131	28							
5_41	5	2	2	0,133	28							
5_42	5	2	2	0,125	28							
5_43	5	2	2	0,131	29							
5_44	5	2	2	0,118	28							
5_45	5	2	2	0,134	28							
5_46	5	2	2	0,123	28							
5_47	5	2	2	0,115	29							

V- EN SÍNTESIS

En este trabajo, hemos analizado los mecanismos de aparición en el urodelo *Salamandra salamandra* de una nueva estrategia reproductora: el viviparismo. Para obtener una visión general, hemos empleado tres aproximaciones distintas que incluyen el estudio filogeográfico de la variabilidad genética de *Salamandra salamandra* en la Península Ibérica, la caracterización de las secuencias ontogenéticas de los individuos vivíparos y ovovivíparos y un análisis de la plasticidad fenotípica del desarrollo en esta especie.

Como veíamos en el Capítulo II, dentro de la familia Salamandridae, la aparición del viviparismo se restringe al género *Salamandra*. Todas las especies de este género son ovovivíparas, es decir, retienen los huevos dentro del útero hasta que el embrión alcanza un desarrollo avanzado, y esta estrategia reproductora ha servido de precursora del viviparismo en alguna de las especies. El viviparismo dentro de la especie *S. salamandra* se habría originado en un grupo restringido de poblaciones, probablemente al inicio del Pleistoceno, después de que se produjera la separación de los cuatro clados de linajes mitocondriales que definíamos tras el análisis filogeográfico (Capítulo II). La separación de estos grandes grupos podría estar relacionada con el inicio de los periodos glaciares que debieron aislar y fragmentar la distribución original de la especie, provocando su diferenciación genética interna. Una vez finalizados los periodos glaciares, o durante algún periodo interglaciar prolongado, las poblaciones pudieron expandir sus áreas de distribución, estableciéndose contactos secundarios entre ellas. En la franja norte de la Península Ibérica, estos contactos permitieron que el viviparismo se transmitiera, junto con otras características como el patrón de coloración rayado, desde su origen hacia poblaciones contiguas en una dirección oeste-este, hasta alcanzar la distribución que observamos hoy en día (Capítulo II).

¿Y qué es lo que se transmite? ¿En qué consiste realmente el viviparismo? Como veíamos en los Capítulos III y IV, la reproducción en *S. s. bernardezi* se caracteriza en primer lugar por una mayor inversión de las madres en la producción de vitelo. La presencia de numerosos huevos abortivos en los úteros maternos, es otra de las características más destacables. La protrusión de vitelo que apreciábamos en estos huevos abortivos (Capítulo III) puede ser indicativa de algún problema genético que altere el funcionamiento normal del proceso de la gastrulación que impediría que continuaran desarrollándose, como se ha visto en otras especies de la familia (Sessions *et al.*, 1998). Además de los huevos abortivos, el viviparismo se caracteriza por tres procesos heterocrónicos relevantes: la aceleración del desarrollo, el pre-desplazamiento del desarrollo de la región anterior del embrión y el pre-desplazamiento de la eclosión. Una vez liberados de las membranas del huevo, los embriones inician su alimentación activa (canibalismo intrauterino), reponiendo así las reservas vitelinas gastadas prematuramente como consecuencias del incremento de las tasas de desarrollo en las primeras fases del desarrollo (Capítulo IV). Cabe destacar que la aparición y el desarrollo de la dentición en los embriones y en las larvas vivíparos no sigue este patrón heterocrónico, a pesar del pre-desplazamiento de la alimentación activa. Blackburn (1992) incide en la necesidad de separar la evolución del modo de puesta del modo de alimentación de la progenie (lecitotrofia *vs.* matrotrofia).

Viviparismo y matrotrofia representan el estado derivado del carácter. Como Blackburn (1992) plantea, ambos procesos pueden haber evolucionado de forma independiente, tanto desde el punto de vista temporal como desde el punto de vista de los factores que hayan inducido o promovido su evolución, aunque la extensión de la retención oviductal de los huevos o embriones puede potenciar la evolución de la matrotrofia al favorecer la comunicación y el intercambio entre la madre y su progenie. En este mismo sentido, Packard *et al.* (1989) argumentan que la eclosión temprana en los embriones vivíparos es también un carácter derivado adquirido subsecuentemente al viviparismo.

El resultado final de la estrategia vivípara es el nacimiento de unos pocos juveniles terrestres que han completado su desarrollo en un tiempo inferior al de los individuos ovovivíparos. Por lo general, se asocia la evolución del viviparismo en los distintos grupos donde ha aparecido con la extensión de la retención oviductal de los embriones (Packard *et al.*, 1989). En nuestro caso no es así. El paso del oviparismo al ovoviviparismo asociado a la diferenciación del género *Salamandra* sí implicó la extensión de la retención. La evolución del viviparismo, por el contrario, implicó una aceleración del desarrollo: los embriones no permanecen más tiempo en los úteros maternos, sino que consiguen completar su desarrollo más rápidamente (Capítulo III).

No se han analizado en detalle las características de todas las formas de viviparismo que aparecen en el género *Salamandra*. En *S. atra* la especie vivípara del género que ha sido más estudiada, se plantea una situación distinta. La hembra ovula más de 100 huevos [huevos de unos 1,5 a 2,2 mm de diámetro, una tamaño mucho menor que el de los huevos de *S. salamandra* (Greven, 1998; Guex & Greven, 1994)]. Sin embargo, sólo un huevo por oviducto va a poder ser fecundado, al ser el único que se rodea de todas las membranas necesarias para la fecundación y completar el desarrollo. El resto de los huevos se desintegran dentro de los úteros, formando una masa nutricia. La eclosión se produce cuando el embrión ya ha consumido la mayor parte de su vitelo. En ese momento (estadio 7 de W10) se empiezan a desarrollar las extremidades posteriores y ya posee una boca funcional para la alimentación por succión. El periodo de gestación completo en *S. atra* dura entre dos y cuatro años (Greven, 1977; 1998). Desde la ovulación y fecundación (entre abril y mayo) hasta la eclosión pasan unos dos meses (Fase I del desarrollo). Posteriormente, la larva intrauterina pasa entre uno y dos años alimentándose de la masa nutricia de vitelo (Fase II del desarrollo). Una vez consumida este fuente de alimento, la larva se desplaza a otra zona especial del útero, denominada la zona trófica, en la que la madre secreta una sustancia alimenticia, estadio coincide con el inicio de la metamorfosis (Fase III del desarrollo). El embrión prosigue ahí su alimentación y desarrollo hasta el momento de la puesta. El viviparismo en *S. atra*, por tanto, implica lecitotrofia, oofagia y matrotrofia (epitelofagia). Hay que destacar que los embriones en la fase II del desarrollo tienen una dentición incipiente característica, en la que los dientes aún no han despuntado y siguen recubiertos de una capa celular (Guex & Greven, 1994), presentando un aspecto muy similar a la dentición de las salamandras vivíparas al inicio de su alimentación activa (oofagia) y al de los embriones ovovivíparos en el mismo estadio de desarrollo pero que siguen envueltos en sus mem-

branas y no han iniciado su alimentación activa (Figs. 60 y 63). Ni las larvas de *S. atra*, ni las de *S. s. bernardezi* necesitan una dentición desarrollada para alimentarse por succión de los huevos abortivos presentes en los úteros. La dentición larvaria en *S. atra* se establece durante la Fase III del desarrollo, en la que se terminan de calcificar los dientes, que son monocúspides como en el caso de *S. salamandra* pero dispuestas en varias hileras (polystichous) en vez de en una sola. Al iniciarse la metamorfosis, empiezan a aparecer algunos dientes bicúspides, característicos de la etapa adulta de los individuos. Este mismo fenómeno, la coexistencia de dientes larvarios y juveniles (monocúspides y bicúspides, respectivamente) durante la metamorfosis y en el inicio de las etapa juvenil, también lo hemos observado en *S. salamandra* (Figs. 68 y 69). A pesar de las diferencias en la duración del desarrollo en ambas especies, la adquisición de la dentición en *Salamandra salamandra* y en *S. atra* es bastante similar y está ligada al tipo de alimentación de las larvas en cada etapa de su desarrollo. Al eclosionar, las larvas presentan una dentición incipiente y, probablemente, de escasa funcionalidad y las larvas se alimentan por succión del vitelo de otros huevos. La dentición larvaria se completa al acercarse la metamorfosis, periodo en el que las larvas se alimentan del epitelio nutricio (*S. atra*), de huevos y otras larvas (*S. s. bernardezi*) o de pequeños crustáceos o insectos (alimentación en las charcas de las larvas ovovivíparas).

El caso de *S. luschani*, especie también vivípara, es un caso intermedio entre el viviparismo de *S. atra* y el de *S. s. bernardezi*. El cortejo suele tener lugar en primavera (abril, mayo) y los embriones y larvas se desarrollan dentro del útero materno hasta su nacimiento, que ocurre entre septiembre y enero (Özetti, 1979). Las hembras suelen liberar únicamente dos juveniles. No existe una zona trófica diferenciada en los úteros; los embriones se alimentan de su reserva vitelina y, una vez agotada, se alimentan de los huevos presentes en los úteros.

Los fenómenos de viviparismo en otras especies del género *Salamandra* son, como hemos visto, fisiológicamente diferentes de los se observan en las poblaciones ibéricas de *S. salamandra*, que además presentan un origen histórico también distinto. Parten de una base común, la extensión de la retención oviductal, carácter que posiblemente represente una sinapomorfía del género (Veith *et al.*, Capítulo II). Pero la evolución de cada estrategia en las diferentes especies ha seguido caminos distintos, aunque adoptando, en algunos casos formas similares. Este es otro ejemplo de homoplasia en la evolución de las estrategias reproductoras en anfibios (Wake, 1992). Recientemente se han descrito casos de viviparismo en otras subespecies o especies de *Salamandra*, como es el caso de poblaciones insulares gallegas de *S. s. gallaica* (Galán, comunicación personal) o poblaciones de *S. algira* en Ceuta (Donaire Barroso, 2001; Martínez *et al.*, 1997). Habrá que estudiar con detalle estas poblaciones para comprobar si se ajustan al mismo tipo de viviparismo que hemos analizado en este trabajo, si se trata de algunos casos excepcionales de retención oviductal extrema o si presentan otro tipo de modificaciones fijadas que las caracterice.

Otro caso particular de viviparismo al que ya hemos hecho referencia a lo largo del trabajo, pero que no hemos analizado en detalle, es el viviparismo en *S. s. fastuosa*.

Esta subespecie, como veíamos en la Introducción y en Capítulo II, se distribuye por Cantabria, el País Vasco y los Pirineos occidentales. Presenta al igual que *S. s. bernardezi* una coloración rayada, un hocico redondeado y una reproducción vivípara y, aunque muy similares en su composición genética nuclear, pertenecen a clados mitocondriales diferentes. Precisamente, el análisis de estas discordancias de los marcadores entre las dos subespecies con poblaciones vivíparas nos sirvió para detallar los procesos históricos y demográficos que han configurado la distribución de las unidades taxonómicas y del viviparismo que observamos en la actualidad. Vimos como la estrategia vivípara habría colonizado las poblaciones cántabras y pirenaicas, a la vez que se transmitían otras características como el patrón de coloración rayado. La estrategia reproductora que siguen las poblaciones de *S. s. fastuosa* se ha denominado por algunos autores como "viviparismo opcional" (Dopazo, 1995; Dopazo & Alberch, 1994). La reproducción "vivípara opcional" sigue las mismas pautas que en *S. s. bernardezi*: una alta proporción de huevos abortivos (hasta el 60%), una eclosión temprana de los embriones, asincronía en el desarrollo, además de fenómenos de oofagia y canibalismo entre larvas. Los nacimientos suelen ocurrir en primavera y las hembras suelen liberar larvas en un avanzado estado de desarrollo pero casi nunca metamorfoseadas, como en el caso de *S. s. bernardezi.* A medida que nos alejamos de las poblaciones asturianas, parece que la estrategia vivípara se vuelve menos rígida. Se podría pensar, intuitivamente, en tres explicaciones alternativas para este fenómeno: (i) la expresión del carácter 'viviparismo' está fuertemente influida por un proceso de plasticidad fenotípica, el ambiente es por tanto un regulador de la expresión del fenotipo vivíparo, (ii) su expresión tiene un componente genético marcado pero que no ha llegado a fijarse en algunas poblaciones o (iii) el viviparismo, además de un componente genético determinante, posee un sistema de regulación epigenético relevante. Los datos que hemos obtenido en este trabajo, indican que la expresión del fenotipo vivíparo (los procesos heterocrónicos o la presencia de huevos abortivo) no dependen del ambiente. No sabemos, tampoco, el grado de determinación genética que pueden presentar estos caracteres. El hecho de que las poblaciones de *S. s. fastuosa*, en un pasado ovovivíparas (Capítulo II), hayan integrado el viviparismo y que esta estrategia no esté bien fijada en las poblaciones nos puede servir de punto de partida para intentar analizar cómo se transmite el viviparismo, a través, por ejemplo, de unos experimentos de cruces controlados entre individuos de ambas subespecies e individuos de alguna subespecie ovovivípara. Un estudio similar se ha llevado a cabo entre poblaciones ovíparas y vivíparas del lacértido *Lacerta vivípara* (Arrayago *et al.*, 1996), donde se llegó a la conclusión de que el viviparismo en esta especie es un carácter codominante que sigue una transmisión mendeliana. La existencia de poblaciones con características intermedias puede ser utilizada para analizar los mecanismos de transmisión de la estrategias reproductoras dentro de una misma especie (Smith & Shine, 1997) ya que, como decíamos en la introducción, la aparición y radiación de las novedades evolutivas debe estudiarse donde realmente ocurre el proceso, esto es, en las poblaciones.

Un punto en el que hemos puesto especial énfasis a lo largo de este trabajo es la necesidad de ampliar las perspectivas de análisis a la hora de plantear hipótesis que

expliquen determinados procesos evolutivos. La aproximación adaptacionista no es suficiente para explicar la variabilidad y diversidad de formas que encontramos en la naturaleza y, en muchos casos, el seguirla puede distorsionar los resultados que obtengamos del análisis. A continuación, planteamos dos casos que pueden ejemplificar esto: el tamaño y los patrones de coloración en *S. salamandra*.

La combinación de procesos heterocrónicos durante el desarrollo embrionario-larvario vivíparo resulta en morfologías juveniles idénticas entre ovovivíparos y vivíparos, exceptuando características propias de cada grupo como los patrones de coloración y el tamaño: los juveniles ovovivíparos suelen medir entre 30 y 65 mm, con una gran variabilidad en los tamaños, variabilidad causada por las diferencias ambientales durante el desarrollo, mientras que los vivíparos suelen medir entre 25 y 50 mm (Capítulo IV). Las salamandras adultas vivíparas presentan un tamaño significativamente menor que ovovivíparas (Barbadillo *et al.*, 1999; Joly, 1968). Como demuestran Alcobendas & Castanet (2000), las diferencias en tamaños de las salamandras adultas se deben a las diferentes tasas de crecimiento que experimentan. Estas diferencias no están mediadas por las condiciones ambientales, sino que se deben a factores internos característicos de las poblaciones vivíparas. No se conocen cuáles son estos 'factores internos'. Ahora bien, a la luz de los datos obtenidos en este trabajo, nos planteamos la posibilidad de que las variables ontogénicas tales como las tasas de desarrollo y diferenciación o los procesos heterocrónicos que hemos observado durante la etapa embrionaria (aceleraciones y pre-desplazamientos) puedan de alguna manera afectar o modular las tasas de crecimiento del individuo adulto. De ser así, si las tasas de crecimiento y de desarrollo durante la etapa embrionaria en las salamandras vivíparas determinan el tamaño final de las salamandras adultas, estaríamos ante un caso de restricción impuesta por el desarrollo larvario sobre la morfología adulta (Alberch, 1989; Wake, 1982).

Podríamos encontrar otro ejemplo en los patrones de coloración. Parichy (1996a; 1996b; 1996c) analiza la formación de los patrones de coloración de las larvas de Ambystomatidae durante la ontogenia. Las células pigmentarias (melanóforos, xantóforos e iridióforos) tienen su origen en las células de la cresta neural. Este autor determina cómo se forman los distintos patrones de coloración (líneas horizontales o rayas verticales) a partir de los diferentes procesos de migración de estas células. Falta por extender estos estudios a otras especies como *S. salamandra* y ver si realmente los patrones de coloración de las larvas condicionan, de nuevo, el patrón de coloración de los adultos (Ebenman, 1992), aunque, de confirmarse, estaríamos ante otro ejemplo de restricción de la morfología adulta impuesta por el desarrollo larvario.

En los dos casos, la expresión de la característica morfológica adulta queda restringida por el carácter larvario. Alberch (1989) argumenta que, durante la evolución de los anfibios, se ha producido una paulatina diferenciación de las formas larvarias de sus respectivas formas adultas como consecuencia de una progresiva especialización o adaptación de cada forma a su ambiente (acuático en las larvas y terrestres en las adultas). El desarrollo está compartimentalizado y esta compartimentalización viene marcada por dos programas de desarrollo redundantes: uno larvario y otro adulto. Ante la imposibilidad

de des-diferenciar estructuras larvarias para volver a transformarlas en estructuras adultas, ALBERCH (1989) propone que existe un doble programa de desarrollo. El proceso metamórfico es, en este contexto, un proceso clave ya que supone el abandono de uno de los programas para iniciar otro, implicando en muchos casos procesos de destrucción de estructuras por apoptosis para crear las nuevas estructuras adultas. El grado de redundancia o de independencia de ambos programas de desarrollo marca en cierta medida el grado de restricción que ejerce la morfología larvaria sobre la morfología adulta. Un ejemplo sería la evolución del desarrollo directo, ya que implica en muchos casos la 'liberación' de las restricciones impuestas por la morfología larvaria sobre la adulta, posibilitando una mayor diversificación de esta última (WAKE, 1982).

Tanto el tamaño de los adultos como los patrones de coloración suelen constituir ejemplos clásicos de adaptaciones de los organismos a su entorno. Sin embargo y como hemos visto, su análisis desde una perspectiva adaptacionista puede quedar, en cierta manera, desvirtuado si la variabilidad potencial del carácter se encuentra drásticamente restringida por el procesos ontogénico. Aquí es donde las aproximaciones internalistas juegan un papel clave a la hora de analizar los procesos evolutivos.

Con los datos presentados en este trabajo, hemos pretendido lograr un dibujo más completo de cómo se ha producido la diversificación de los modos de reproducción en *Salamandra salamandra*. Otras cuestiones acerca de esta especie no han sido tratadas, aunque merecen una especial mención, como puede ser la posición taxonómica intraespecífica en *Salamandra salamandra*. Este trabajo muestra la complejidad de las interacciones entre grupos de poblaciones diferenciados genéticamente. Así, en unos casos muestran marcadores mitocondriales muy diferenciados dentro de una única subespecie (caso de *S. s. bernardezi*) o, al contrario, mitocondriales idénticos entre subespecies bien diferenciadas a nivel nuclear (caso de *S. s. terrestris* y *S. s. fastuosa*). Esta complejidad y las limitaciones en el área geográfica estudiada (fundamentalmente, el área de influencia del viviparismo) no permiten abordar en el ámbito de esta tesis el problema taxonómico infraespecífico, pero sí señalar que el tema requiere un análisis en profundidad.

VI- CONCLUSIONES

1- Los escenarios reflejados por los marcadores moleculares nucleares y mitocondriales, lejos de representar hipótesis alternativas, revelan la misma historia evolutiva del grupo pero en diferentes momentos históricos. El análisis de las discordancias entre los marcadores nos muestra cómo la distribución de la variabilidad genética que observamos en la actualidad es el resultado de procesos de divergencia antiguos, así como de procesos demográficos más recientes una vez establecidos los contactos secundarios entre los grupos de poblaciones ya diferenciados.

2- Las subespecies de *S. salamandra* descritas en la Península Ibérica son, desde un punto de vista genético, agrupaciones parafiléticas de poblaciones. Las poblaciones ibéricas de *S. salamandra* pueden agruparse en cuatro grandes clados mitocondriales que tienen su origen entre el Plioceno superior y Pleistoceno.

3- En uno de estos clados mitocondriales surgió el viviparismo y se transmitió, junto con otras características como el patrón rayado de coloración a los clados mitocondriales vecinos en una dirección oeste-este a lo largo de la cornisa cantábrica.

4- A partir de la comparación de las secuencias ontogénicas ovovivíparas y vivíparas, comprobamos que hay tres procesos heterocrónicos que caracterizan esta estrategia: la aceleración del desarrollo de los embriones tanto en su desarrollo temprano como después de iniciar su alimentación activa, el pre-desplazamiento del desarrollo de la región anterior del embrión y el pre-desplazamiento de la eclosión.

5- Además, esta aceleración del desarrollo permite en la estrategia vivípara, la aparición de fenómenos de canibalismo intrauterino (a pesar de que el desarrollo de la dentición de estas larvas no presente signos de pre-desplazamiento en esta estrategia).

6- El viviparismo en *S. s. bernardezi* no implica una extensión de la retención oviductal de los embriones, sino una aceleración de su desarrollo.

7- Las condiciones ambientales determinan claramente tanto las tasas de desarrollo, como el tamaño de los metamórficos o la duración del periodo larvario.

8- El tamaño inicial de las larvas al nacer también condiciona estos parámetros. El tamaño inicial puede ser considerado como un efecto materno y su influencia sobre el desarrollo dependerá, en parte, de las condiciones ambientales.

9- Encontramos una covariación muy significativa entre tamaño en la metamorfosis y la duración del periodo larvario en todas las familias de larvas estudiadas. La existencia de esta pleiotropía antagonista puede ser considerada como una restricción para la evolución de los fenotipos.

10- Tanto las trayectorias de crecimiento, las tasas de crecimiento y las respuestas fenotípicas de las diferentes familias en los distintos ambientes son similares. No hemos detectado variabilidad genética en la plasticidad fenotípica, lo que también restringe el potencial evolutivo de la norma de reacción de estos genotipos.

11- Como hemos visto en este trabajo, no es suficiente adoptar una aproximación adaptacionista para entender o explicar la aparición de una novedad evolutiva en un linaje. La integración de los datos provenientes de otras aproximaciones, especialmente la aproximación internalista, se hace imprescindible.

VI- BIBLIOGRAFÍA

ABOUHEIF, E. 1997. Developmental genetics and homology: a hierarchical approach. *TREE* **12**(**10**): 405-408.

ALBERCH, P. 1980. Ontogenesis and morphological diversification. *Amer. Zool.* **20**: 653-667.

ALBERCH, P. 1982. The generative and regulatory roles of development in evolution. En: D. M. A. G. Roth (eds.), Environmental Adaptation and Evolution, pp. 19-36. Gustav Fisher, Stuttgart, New York.

ALBERCH, P. 1985. Problems with the interpretation of developmental sequences. *Syst. Zool.* **34** (**1**): 46-58.

ALBERCH, P. 1987. Evolution of a developmental process: irreversibility and redundancy in amphibian metamorphosis. En: R. A. Raff y E. Raff (eds.), Development as an Evolutionary Process, pp. 23-46. Marine Biological Laboratories (Woods Hole, MA) Lectures in Biology Series, vol.8, Alan R. Liss, Inc.

ALBERCH, P. 1989. Development and the evolution of amphibian metamorphosis. En: H. Splechtna y H. Hilgers (eds.), Trends in Vertebrate Morphology, pp. 163-173. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

ALBERCH, P. 1995. "Ontogeny and Phylogeny" revisited: 18 years later of heterochrony and developmental constraints. En: R. Arai, M. Kato and Y. Doi (eds.), Biodiversity and Evolution, pp. 229-249. The National Science Museum Fondation, Tokyo.

ALBERCH, P. & M. J. BLANCO. 1993. Process and outcome: evolutionary analysis of morphological patterns. En: H. G. Ohtmer. *et al.* (eds.), Experimental and theoretical advances in biological patterns formation, pp. 11-20. Plenum Press, New York.

ALBERCH, P. & M. J. BLANCO. 1996. Evolutionary patterns in ontogenetic transformation: from laws to regularities. *Int. J. Dev. Biol.* **40**: 845-858.

ALBERCH, P., S. J. GOULD, G. FOSTER & D. B. WAKE. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology* **5**: 296-317.

ALCOBENDAS, M., H. DOPAZO & P. ALBERCH. 1996. Geographic variation in allozymes of populations of *Salamandra salamandra* (Amphibia: Urodela) exhibiting distinct reproductive models. *J. Evol. Biol.* **9**: 83-102.

ALCOBENDAS, M. & J. CASTANET. 2000. Bone growth plasticity among populations of *Salamandra salamandra*: interactions between internal and external factors. *Herpetologica* **56** (**1**): 14-26.

ANDREWS, R. M., C. P. QUALIS & B. R. ROSE. 1997. Effects of low temperature on embryonic development of *Sceloporus* lizards. *Copeia* **1997** (**4**): 827-833.

ARMBRUSTER, W. S. & K. E. SCHWAGERLE. 1996. Causes of covariation of phenotypic traits among populations. *J. Evol. Biol.* **9**: 261-276.

ARMSTRONG, J. B., S. T. DUHON & G. M. MALACINSKI. 1989. Raising the axolotl in captivity. En: J. B. Armstrong and G. M. Malacinski (eds.): Developmental Biology of the Axolotl, pp. 220-227, Oxford University Press, New York.

ARRAYAGO, M. J., A. BEA & B. HEULIN. 1996. Hybridization experiments between oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara*: a new insight into the evolution of viviparity in reptiles. *Herpetologica* **52** (**3**): 333-342.

AVISE, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman y Hall, New York.

AVISE, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol. Ecol.* **7**: 371-379.

AVISE, J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, USA.

AVISE, J. C., J. ARNOLD, R. M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMB, J. E. NEIGEL, C. A. REEB & N. C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.

AZEVEDO, R. B. R., V. FRENCH & L. PARTRIDGE. 1997. Life-history consequences of egg size in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* **150**: 250-282.

BALLARD, J. W. O. & M. KREITMAN. 1995. Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *TREE* **10**: 485-488.

BARBADILLO, L. J. 1987. La guía Incafo de los Anfibios y Reptiles de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias. Incafo S.A., Madrid.

BARBADILLO, L. J. 1989. Descripción del desarrollo embrionario de *Triturus boscai*, Lataste 1879 (Urodela, Salamandridae). *Rev. Esp. Herp.* **3** (**2**): 209-220.

BARBADILLO, L. J., J. I. LACOMBA, V. PÉREZ MELLADO, V. SANCHO, Y& L. F. LÓPEZ JURADO. 1999. Anfibios y Reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. GeoPlaneta, Barcelona.

BEDRIAGA, V J. 1883. Reiträge zur Kenntnis der Amphibien und Reptilien der Fauna von Korsika. *Arch. Naturgesch*, Berlin **49** (**1**): 124-273.

BERLOCHER, S. H. & D. L. SWOFFORD. 1997. Searching for phylogenetic trees under the frequency parsimony criterion: an approximation using generalized parsimony. *Syst. Biol.* **46**: 211-215.

BERNARDO, J. 1996. Maternal effects in animal ecology. *Am. Zool.* **36**: 83-105.

BERVEN, K. A. 1987. The heritabililty basis of variation in larval developmental patterns within populations of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Evolution* **41:** 1088-1097.

BERVEN, K. A. 1990. Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology* **71**: 1599-1608.

BERVEN, K. A. & B. G. CHADRA. 1988. The relationship among egg size, density and food level on larval development in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Oecologia* **75**: 67-72.

BLACKBURN, D. G. 1992. Convergent evolution of viviparity, matrotrophy, and specializations for fetal nutrition in reptiles and other vertebrates. *Amer. Zool.* **32**: 313-321.

BLACKBURN, D. G. 1994. Discrepant usage of the term "ovoviviparity" in the herpetological literature. *Herpetol. J.* **4**: 65-72.

BLANCO, M. J. & P. ALBERCH. 1992. Caenogenesis, developmental variability, and evolution in the carpus and the tarsus of the marbled newt *Triturus marmoratus*. *Evolution* **46**: 677-687.

BLOUIN, M. S. 1992a. Genetic correlations among morphometric traits and rates of growth and differentiation in the green tree frog, *Hyla cinerea*. *Evolution* **46**: 735-744.

BLOUIN, M. S. 1992b. Comparing bivariate reaction norms among species: time and size at metamorphosis in three species of *Hyla* (Anura: Hylidae). *Oecologia* **90**: 288-293.

BOCAGE, J. V. B. 1864. Notice sur un batracien nouveau du Portugal (*Chioglossa lusitanica*, NOB). *Proc. Zool. Soc. Lond.* **264-265**.

BOLT, J. R. 1969. Lissamphibian origins: possible protolisamphibian from the lower Permian from Oklahoma. *Science* **166**: 888-891.

BOLT, J. R. 1979. *Amphibamus randiceps* as a juvenile dissorophi: evidence and implications. En: M. H. Nitecki (ed.), *Mazon Creek Fossils*, pp. 529-563. Academic Press, New York.

BOLZERN, A. M., S. CROPPELLI, R. PENNATI & C. SOTGIA. 2000. Omologia tra l'organo adesivo degli anfibi anuri e i bilancieri degli anfibi urodeli. *Riv. idrobiol.* **38 (1-3)**: 27-32.

BONNER, J. R. (ed.). 1982. Evolution and Development. Springer-Verlag, Berlín.

BROWN, B. W. JR. & M. HOLLANDER. 1977. Statistics: a Biomedical Introduction. John Wiley y Sons, New York

BUCKLEY, D. & M. ALCOBENDAS. 2002. *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758). En: Pleguezuelos, J. M., R. Márquez y M. Lizana (eds.), Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España, pp. 55-57. Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Asociación Herpetológica Española, Madrid.

BULL, J. J. 1987. Evolution of phenotypic variance. *Evolution* **41**: 303-315.

BUTH, D. G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. *Ann Rev. Ecol. Syst.* **15**: 501-522.

CASTELLOE, J. & A. R. TEMPLETON. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Mol. Phyl. Evol.* **3** (**2**): 102-113.

CAVALLI-SFORZA, L. L. & A. W. F. EDWARDS. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* **21**: 550-570.

CLEMEN, V. G. 1984. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Oropaharyngealepithel der Larve von *Salamanadra salamandra* (L.) (Urodela: Salamandridae). *Anat. Anz., Jena* **156**: 257-283.

CLEMEN, V. G. & H. GREVEN. 1974. Morphologische Untersuchungen an der Mundhöhle von Urodelen I. Die Gaumenzähne von *Salamandra salamandra* (L.) (Salamandridae: Amphibia). *Forma Functio* **7**: 249-280.

CLEMEN, V. G. & H. GREVEN. 1994. The bucal cavity of larval and metamorphosed *Salamandra salamandra*: structural and developmental aspects. *Mertensiella* **4**: 83-109.

CLEMENT, M., D. POSADA & K. A. CRANDALL. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657-1659.

COLLAZO, A. 1994. Molecular heterochrony in the pattern of fibronectin expression during gastrulation in ambphibians. *Evolution* **48**: 2037-2045.

COLLAZO, A. 1996. Evolutionary correlations between early development and life history in Plethodontid salamanders and teleost fishes. *Amer. Zool.* **36**: 116-131.

COLLAZO, A. & S. B. MARKS. 1994. Development of *Gyrinophilus porphyriticus*: identification of the ancestral developmental pattern in the salamander family Plethodontidae. *J. Exp. Zool.* **268**: 239-258.

CRACRAFT, J. 1990. The origin of evolutionary novelties: pattern and process at different hierarchical levels. En M. H. Nitecki (ed.), Evolutionary Innovations, pp. 21-44. The University of Chicago Press, Chicago-London.

CRAWFORD, A. J. & D. B. WAKE. 1998. Phylogenetic and evolutionary perspectives on an enigmatic organ: the balancer of larval caudate amphibians. *Zoology* **101**: 107-123.

CROWLEY, T. & G. R. NORTH. 1991. Paleoclimatology. Oxford University Press, New York.

CUMMINS, C. P. 1986. Temporal and spatial variation in egg size and fecundity in *Rana temporaria*. *J. Anim. Ecol.* **55**: 303-316.

CURTIS, H. & S. N. BARNES. 2001. Biología. Ed. Médica Panamericana, S. A. Madrid.

CURTSINGER, J. W., P. M. SERVICE & T. PROUT. 1994. Antagonistic pleiotropy reversal of dominance and genetic polymorphism. *Am. Nat.* **144**: 210-228.

CHARLESWORTH, B. 1990. The evolutionary genetics of adaptation. En: M. H. Nitecki (ed.), Evolutionary Innovations, pp. 47-70. The University of Chicago Press, Chicago-London.

DARWIN, C. 1859. The Origin of Species. John Murray, Londres.

DE BEER, G. R. 1930. Embryology and Evolution. Oxford Univesity Press, Clarendom, Oxford (UK).

DE BEER, G. R. 1958. Embryos and Ancestors. Oxford University Press, Oxford (UK).

DEGANI G., S. GOLDENBERG & M. R. WARBURG. 1980. Cannibalistic phenomena in *Salamandra salamandra* larvae in certain water bodies and under experimental conditions. *Hydrobiologia* **75**: 123-128.

DEL PINO, E. U. 1983. A novel development pattern for frogs: gastrulation produces an embryonic disk. *Nature* **306**: 589-591.

DEL PINO, E. M. 1989. Marsupial frogs. *Sci. Am.* **260**: 110-118.

DENNETT, D. C. 1999. La Peligrosa Idea de Darwin. Galaxia Gutemberg, Barcelona.

DENÖEL, M. & P. JOLY. 2000. Neoteny and progenesis as two heterochronic processes involved in paedomorphosis in *Triturus alpestris* (Amphibia: Caudata). *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**: 1481-1485.

DENVER, R. J. 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Amer. Zool.* **37**: 172-184.

DOBZHANKY, TH. 1937. Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York.

DONAIRE BARROSO, D. 2001. Confirmación de desarrollo larvario completo intrauterino en *Salamandra algira* (Bedriaga, 1883) el noroeste de Marruecos. *Bull. Soc. Cat. Herp.* **15**: 107-110.

DOPAZO, H. 1995. Evolución intraespecífica de una característica macroevolutiva: viviparismo en *Salamandra salamandra*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

DOPAZO, H. & P. ALBERCH. 1994. Preliminary results on optional viviparity and intrauterine siblicide in *Salamandra salamandra* populations from northern Spain. *Mertensiella* **4**: 125-138.

DOPAZO, H. J. & M. KORENBLUM. 2000. Viviparity in *Salamandra salamandra* (Amphibia: Salamandridae): Adaptation or exaptation? *Herpetologica* **56** (**2**): 144-152.

DUBOULE, D. 1994. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Development* **1994** (supplement): 135-142.

DUELLMAN, W. E. & L. TRUEB. 1986. Biology of Amphibians. Mc Graw-Hill, New York.

DÜNKER, N., M. H. WAKE & W. M. OLSON. 2000. Embryonic and larval development in the caecilian *Ichthyophis kohtaoensis* (Amphibia, Gymnophiona): a staging table. *J. Morph.* **243**: 3-34.

EAKIN, R. M. 1978. Vertebrate Embriology: a Laboratory Manual. University of California Press, Berkeley y Los Angeles.

EISELT, J. & B. LANZA. 1956. *Salamandra salamandra gigliolii*, subsp. nov. aus Italien. *Abh. Ber. Mus. Naturk. Vorgesch. Magdeburg* **10**: 3-11.

ELINSON, R. P. 1987. Change in developmental patterns: embryos of amphibians with large eggs. En: Raff, R. A. y E. C. Raff (eds.), Development as an Evolutionary Process, pp 1-21. Alan R. Liss, Inc. New York.

Elinson, R. P. & E. M. Del Pino. 1985. Cleavage and gastrulation in the egg-brooding marsupial frog, *Gastrotheca riobambae*. *J. Embryol. Exp. Morph.* **90**: 223-232.

Emerson, S. B. 1986. Hetreochrony and frogs: the relationship of a life history trait to morphological form. *Am. Nat.* **127**: 167-183.

Eriksson, T. 1998. AutoDecay versión 4.0. Programa distribuido gratuitamente por el autor en la web: http://www.bergianska.se/personal/TorstenE/

Exbrayat, J. M. & S. Hraoui-Bloquet. 1994. An example of heterochrony: The meamorphosis in Gymnophiona. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **119**: 117-126

Falconer, D. S. 1952. The problem of environment and selection. *Am Nat* **86**: 293-298.

Falconer, D. S. 1989. Introduction to Quantitative Genetics. 3rd. Edition, Longman Group UK Limited, Essex, UK.

Farris, J. S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* **19**: 83-92.

Farris, J. S. 1972. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Am. Nat.* **106**: 645-668.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 3.5c. Programa distribuido gratuitamente por el autor en la web: http://evolution.genetics.washington.edu/

Fisher, R. A. 1930. The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendom Press, Oxford, UK.

Futuyma, D. J. 1998. Evolutionary Biology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

Galis, F. 2001. Key innovations and radiations. En Wagner, G. P. (ed.): The Character Concept in Evolutionary Biology, pp 581-605. Academic Press, San Diego.

Gans, C. 1989. Stages in the origin of vertebrates: Analysis by means of scenarios. *Biol. Rev.* **64**: 221-268.

García-París, M. 1985. Los Anfibios de España. Ed. Publicaciones de Extensión Agraria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

García-París, M., M. Alcobendas & P. Alberch. 1998. Influence of the Guadalquivir river basin on mitochondrial DNA evolution on *Salamandra salamandra* (Caudata: Salamandridae) from southern Spain. *Copeia* **1998**: 173-176.

García-París, M., M. Alcobendas, D. Buckley & D. Wake. 2003. Dispersal across contact zones in Iberian populations of fire salamanders (*Salamanda salamandra*) inferred from discordance of genetic and morphological traits. *Evolution* **57** (**1**): 129-143.

Gasche, P. 1939. Beitrag zur Kenntnis der Entwicklung von *Salamandra salamandra* L. mit besonderer Berücksichtigung der Winterphase, der Metamorphose und des Verhaltens der Schilddrüse (Glandula thyreoidea). *Rév. Suisse Zool.* **46**: 405-548.

Gould, S. J. 1977. Ontogeny and Phylogeny. Harvard Unviversity Press, Cambridge, Massachusetts.

Gould, S. J. & R. C. Lewontin. 1979. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **205**: 581-598.

Gould, S. J. & E. S. Vrba. 1982. Exaptation-a: missing term in the science of form. *Paleobiology* **8**: 4-15.

Greven, H. 1977. Comparative ultraestructure investigations of the uterine epithelium in the viviparous *Salamandra atra* Laur. and the ovoviviparous *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia, Urodela). *Cell Tiss. Res.* **181**: 215-237.

Greven, H. 1998. Suevey of the oviduct of Salamandrids with special reference to the viviparous species. *J. Exp. Zool.* **282**: 507-525.

GREVEN, H. & G. D. GUEX. 1994. Structural and physiological aspects of viviparity in *Salamandra salamandra*. *Mertensiella* **4**: 139-160.

GUEX, G. D. & H. GREVEN. 1994. Structural and physiological aspects of viviparity in *Salamandra atra*. *Mertensiella* **4**: 161-208.

GUILLETTE, L. J. J., E. R. JONES, K. T. FITZGERALD & H. M. SMITH. 1980. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus*. *Herpetologica* **36**: 201-215.

HAECKEL, E. 1866. Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch nichtwissenschaftlichten Schrifftum. Peter Lang, Frankfurt am Main.

HALDANE, J. B. S. 1932. The Causes of Evolution. Longmans, Green, New York.

HALL, B. K. 1992. Evolutionary Developmental Biology. Chapman y Hall, Halifax, Canada.

HANKEN, J. 1999. Larvae in amphibian development and evolution. En: B. K. Hall y M. H. Wake (eds.), The Origin and Evolution of Larval Forms, pp. 61-108. Academic Press, San Diego, California.

HANKEN, J. & R. WASSERSUG. 1981. The visible skeleton. *Funct. Photo.* **16**: 22-26.

HARRIS, H. & D. A. HOPKINS. 1976. The Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. Amsterdam, North-Holland Publishing Company.

HARRISON, R. G. 1969. Organization and Development of the Embryo. Yale University Press, New haven, USA.

HARRISON, R. G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *TREE* **4**: 6-11.

HART, M. W. & G. A. WRAY. 1999. Heterochrony. En B. K. Hall y M. H. Wake (eds.), The Origin and Evolution of Larval Forms, pp. 159-165. Academic Press, San Diego, California.

HENNIG, W. 1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana.

HEULIN, B., C. GUILLAUME, A. BEA & M. J. ARRAYAGO. 1993. Interprétation biogégraphique de la bimodalité de réproduction du lézard *Lacerta vivipara* -Jacquin- (Sauria, Lacertidae): un modèle pour l'étude de l'évolution de la viviparité. *Biogeographica* **69** (**1**): 3-13.

HEWITT, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice age, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linnean Soc.* **58**: 247-276.

HILLIS, D. M. 1984. Misuse and modification of Nei´s genetic distance. *Syst. Zool.* **33** (**2**): 238-240.

HILLIS, D. M. & J. J. BULL. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidencen in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 182-192.

HILLIS, D. M., B. K. MABLE, A. LARSON, S. K. DAVIS & E. A. ZIMMER. 1996. Nucleic acids IV: sequencing and cloning. En: D. M. Hillis, C. Moritz, y B Mable (eds.), Molecular Systematics. pp. 321-384. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachussetts, USA.

HOEH, W. R., D. T. STEWART & S. J. GUTTMAN. 2002. High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia: Unioidea). *Evolution* **56** (**11**): 2252-2261.

HOLTMEIER, C. L. 2001. Heterochrony, maternal effects, and phenotypic variation among sympatric pupfishes. *Evolution* **55**: 330-338.

HUDSON, R. R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Ox. Surv. Evol. Biol.* **7**: 1-44.

HUELSENBECK, J. P. & K. A. CRANDALL. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximun likelihood. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **28**: 437-466.

HUELSENBECK, J. P. & F. R. RONQUIST. En prensa. Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogeny. *Biometrics.*

HULL, D. L. & M. RUSE (eds.). 1998. The philosophy of Biology. London. Oxford University Press.

IRISH, F. J. 1989. The role of heterochrony in the origin of a novel bauplan: evolution of the ophidian skull. *Géobios,* **mémoire spéciale nº 12**: 227-233.

JOCKUSCH, E. L. 1997. Geographic variation and phenotypic plasticity of number of trunk vertebrae in slender salamanders, *Batrachoseps* (Caudata: Plethodontidae). *Evolution* **51 (6)**: 1966-1982.

JOGER, U. & S. STEINFARTZ. 1994a. Zur subspezifischen Gliederung der südiberischen Feuersalamander (Salamandra salamandra-Komplex). *Abh. Ber. Naturkd.* **17**: 83-98.

JOGER, U. & S. STEINFARTZ. 1994b. Electrophoretic investigations in the evolutionary history of the west mediterranean *Salamandra. Mertensiella* **4**: 241-254.

JOHNS, G. C. & J. C. AVISE. 1998. A comparative summary of genetic distances in Vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1481-1490.

JOLY, J. 1968. Données écologiques sur la salamandre tachetée *Salamandra salamandra* (L.). *Ann. Sci. Nat. Zool.* **10**: 301-366.

JOLY, J., F. CHESNEL & D. BOUJARD. 1994. Biological adaptation and reproductive strategies in the genus *Salamandra. Mertensiella* **4**: 255-269.

KAPLAN, R. H. 1991. Developmental plasticity and maternal effects in amphibian life histories. En E. C. Dudley (ed.), The Unity of Evolutionary Biology, pp. 794-799.

KAPLAN, R. H. 1992. Greater maternal investment can decrease offspring survival in the frog *Bombina orientalis. Ecology* **73**:280-288.

KAPLAN, R. H. 1998. Maternal effects, developmental plasticity, and life-history evolution. En: T. A. Mousseau y C. W. Fox (eds.), Maternal Effects as Adaptations, pp 244-260. Oxford Univesity Press, New York.

KAPLAN, R. H. & E. G. KING. 1997. Egg size is a developmentally plastic trait: evidence from long term studies in the frog *Bombina orientalis. Herpetologica* **53** (**2**): 149-165.

KEARSEY, M. J. & H. S.POONI. 1996. The Genetic Analysis of Quantitative Traits. Stanley Thornes (Publishers) Ltd.

KELLER, R. E. 1986. The cellular basis of amphibian gastrulation. En: C. W. Browder (ed.), Developmental Biology: a Comprehensive Synthesis, Vol. 2, pp. 241-237. Plenum Press, New York.

KLINGENBERG, C. P. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biol. Rev.* **73**: 79-123.

KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PÄÄBO & F. X. VILLABLANCA. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6196-6200.

KOPP, M. & B. BAUR. 2000. Intra- and inter-litter variation in life-history traits in a population of fire salamanders (Salamandra salamandra terrestris). *J. Zool. Lond.* **250**: 231-236.

KUSANO, T., H. KUSANO & K. MIYASHITA. 1985. Size-related cannibalism among larval *Hynobius nebulosus. Copeia* **1985**: 472-476.

LACÉPÈDE, CONDE DE. 1788. Histoire Naturelle des Quadrupèdes ovipares et des serpents. Tomo 1, 651 pp. Paris.

LANDE, R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution* **33**: 402-416.

LAURENTI, R. 1768. Specimen medicum exhibens sinopsis reptilium. 214 pp, Iena.

LEE, M. S. Y. 1999a. Molecular phylogenies become functional. *TREE* **14** (**5**): 177-178.

LEE, M. S. Y. 1999b. Circularity, evolution, systematics... and circularity. *J. evol. Biol.* **12**: 724-734.

LEWIS, P. O. & D. ZAYKIN. 2001. Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1 (d16c). Programa gratuito distribuido por los autores en la web: http\\:lewis.eeb.uconn.edu/leweishome/software.html

LINNAEUS, C. A. 1758. Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locus. Editio decima, reformata. Tomus 1.

MABEE, P. M. & J. HUMPHRIES. 1993. Coding polymorphic data: examples from allozymes and ontogeny. *Syst. Biol.* **42**: 166-181.

MADDISON, W. P. & D. R. MADDISON. 1992. MacClade: analysis of phylogeny and character evolution (version 3.0). Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

MALKMUS, R. 1983. Beschreibung einer neuen Form des Feuersalamanders der Serra de Monchique (Portugal): *Salamandra salamandra* (*gallaica*) *crespoi* n. subsp. *Faun. Abh. Mus. Tierk. Dresden* **10**(**9**): 169-174.

MANLY B. F. J. 1985. The Statistics of Natural Selection. Chapman and Hall, London.

MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**: 209-220.

MARDULYN, P. & J. M. PASTEELS. 1994. Coding allozyme data using steps matrices: defining new original states for the ancestral taxa. *Syst. Biol.* **43**: 567-572.

MARET, T. J. & J. P.COLLINS. 1994. Individual responses to population size structure: the role of size variation in controlling expression of a trophic polymorphism. *Oecologia* **100**: 279-285.

MARKS, S. B. & A. COLLAZO. 1998. Direct development in *Desmognathus aenus* (Caudata: Plethodontidae): a staging table. *Copeia* **1998** (**3**): 637-648.

MARTENS, V. 1885. Über Vorkommen und Zeichnungs-Varietëten von *Salamandra maculosa. Sitzungsber. Ges. Naturf. Fr.* Berlin, **10**: 193-195.

MARTÍNEZ, F. J., J. L. RUIZ & L. MOHAMED. 1997. Una nueva especies para la herpetofauna de Ceuta: *Salamandra salamandra algira. Bol. Asoc. Herp. Esp.* **8**: 6-8.

MATHIES, T. & R. M. ANDREWS. 1995. Thermal and reproductive biology of high and low elevation population of the lizard *Sceloporus scalaris*: implications for the evolution of viviparity. *Oecologia* **104**: 101-111.

MAYNARD SMITH, J., R. BURIAN, S. KAUFMAN, P. ALBERCH, J. AMPBELL, B. GOODWIN, R. LANDE, D. RAUP & L. WOLPERT. 1985. Developmental constraints and evolution. *Q. Rev. Biol.* **60** (**3**): 265-287.

MAYR, E. 1942. Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York.

MAYR, E. 1976. Evolution and the divesity of life. The Belknap Press of Harvard Univesity Press. Cambridge, Massachussetts.

MCKINNEY, M. L. & K. J. MCNAMARA. 1991. Heterochrony. The evolution of ontogeny. Plenum Press, New York, London.

MÉNDEZ DE LA CRUZ, F. R., M. VILLAGRÁN SANTA CRUZ & R. M. ANDREWS. 1998. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus. Herpetologica* **54** (**4**): 521-532.

MICKEVICH, M. F. & M. F. JOHNSON. 1976. Congruence between morphological and allozyme data in evolutionary inference and character evolution. *Syst. Zool.* **25**: 260-270.

MICKEVICH, M. F. & C. MITTER. 1981. Treating polymorphic characters in systematics: a phylogenetic treatment of electrophoretic data. En: V. A. Funk y D. R. Brooks (eds.), Advances in Cladistic: Proceedings of the First Meeting of the Wili Hennig Society, pp. 45-58. New York.

MICKEVICH, M. F. & C. MITTER. 1983. Evolutionary patterns in allozyme data: a systematic approach. En N. L. Platnick y V. A. Funk (eds.), Advances in Cladistics, pp. 19-176. Columbia University Press, New York.

MINDELL, D. P. & A. MEYER. 2001. Homology evolving. *TREE* **16**(8): 434-440.

MORITZ, C., T. E. DOWLING & W. M. BROWN. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 269-292.

MORITZ, C., C. J. SCHNEIDER & D. B. WAKE. 1992. Evolutionary relationships within the *Ensantina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Syst. Biol.* **41**: 273-291.

MUSKHELISHVILI, T. A. 1964. New findings about the reproduction of the Caucasus salamander (*Mertensiella caucasica*). *Soobshch. Akad. Nauk. Gruz. SSR.* **36**: 183-185.

MÜLLER, L. & W. HELLMICH. 1935 Mitteilungen über die Herpetofauna der Iberischen Halbinsel. I. Über *Salamandra salamandra almanzoris* n. ssp. und *Bufo bufo gredosicola* n. ssp., zwei neue Amphibienrassen aus der Sierra de Gredos. *Zool. Anz.* **112** (**3/4**): 49-57.

MULLIS, K. B. & F. A. FALOONA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.

MURPHY, R. W. 1993. The phylogenetic analysis allozyme data: invalidity of coding alleles by presence/absence and recommended procedures. *Biochem. Syst. Ecol.* **21**: 25-38.

MURPHY, R. W. & K. D. DOYLE. 1998. Phylophenetics: frequencies and polymorphic characters in genealogical estimation. *Syst. Biol.* **47**: 737-761.

MURPHY, R. W., J. W. SITES, D. G. BUTH & C. H. HAUFLER. 1996. Proteins: isozyme electrophoresis. En: D. M. Hillis, C. Moritz, y B Mable (eds.) Molecular Systematics. pp 51-120. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachussetts, USA.

NASCETTI, G., F. ANDREONE, M. CAPULA & L. BULLINI. 1988. A new Salamandra species from South-Western Alps. *Boll. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino* **6**: 617-638.

NEI, M. 1978. Estimation of average hetozygosity and genetic distances from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.

NEI, M. & S. KUMAR. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. University Press, Inc. Oxford, New York.

NEIGEL, J. E. & J. C. AVISE. 1993. Application of random-walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. *Genetics* **135**: 1209-1220.

NESTEROV, P. V. 1916. Tri novyx' xvostatyx' amfioii iz' Kurdistana. *Ann. Mus. Zool. Acad. Sci. Petrograd* **21**: 1-30.

NEWMAN, R. A. 1988. Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution* **42**: 774-783.

NEWMAN, R.A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *Bioscience* **42**: 671-678.

NEWMAN, R. A. 1994. Genetic variation for phenotypic plasticity in the larval life history of spadefoot toads (*Scaphiopus couchii*). *Evolution* **48**: 1773-1785.

NEWMAN, R. A. & A. E. DUNHAM. 1994. Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia* **1994**: 372-381.

NIEWIAROWSKI, P. H. 1995. Effects of supplemental feeding and thermal environment on growth rates of eastern fence lizards. *Herpetologica* **51**: 487-496.

NITECKI, M. H. 1990. The plurarity of evolutionary innovations. En M. H. Nitecki (ed.), Evolutionary Innovations, pp. 3-18. The Chicago University Press, Chicago-Londres.

NORTHCUTT, R. G., K. C. CATANIA & B. B. CRILEY. 1994. Electroreceptors and mechanosensory lateral lines arise from single placodes in axolotls. *Dev. Biol.* **168**: 358-373.

OBST, F. J. 1981. Der Feuersalamander des Pirin-Gebirges in Bulgarien als *Salamandra salamandra beschkovi* subsp. n. eine vorlaufige Mitteilung (Amphibia, Urodela, Salamandridae). *Faun. Abh.* **8** (**20**): 197-201.

OOSTERBROEK, P. & J. W. ARNTZEN. 1992. Area-cladrograms of Circum-Mediterranean taxa in relation to Mediterranean palaeogeography. *J. Biogeography* **19**: 3-20.

OSTER, G. & P. ALBERCH. 1982. Evolution and bifurcation of developmental programs. *Evolution* **36**: 444-459.

ÖZETI, N. 1967. The morphology of the salamander *Mertensiella luschani* (Steindachner) and the relationships of *Mertensiella* and *Salamandra*. *Copeia* **1967**: 287-298.

ÖZETI, N. 1979. Reproductive biology of the salamander *Mertensiella luschani antalyana*. *Herpetologica* **35** (**3**): 193-197.

ÖZETI, N. & D. WAKE. 1969. The morphology and evolution of the tongue and associated structures in salamanders and newts. *Copeia* **1969**: 91-123.

PACKARD, G. C., R. P. ELINSON, J. GAVAUD, L. J. GUILLETTE JR., J. LOMBARDI, J. SCHINDLER, R. SHINE, H. C. TYNDALE-BISCOE, M. H. WAKE, F. D. J. XAVIER & Z. YARON. 1989. How are reproductive systems integrated and how has viviparity evolved?. En: D. B. Wake y G. Roth (eds.), Complex Organismal Functions: Integration and Evolution in Vertebrates, pp. 281-293. John Wiley y Sons Ltd., New York.

PALUMBI, S. R. 1996. Nucleic acids II: The Polymerase Chain Reaction. En: D. M. Hillis, C. Moritz, y B Mable (eds.), Molecular Systematics, pp. 205-247. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachussetts, USA.

PARICHY, D. M. 1996a. Salamander pigment patterns: how can they be used to study developmental mechanisms and their evolutionary transformation? *Int. J. Dev. Biol.* **40**: 871-884.

PARICHY, D. M. 1996b. When neural crest and placodes collide: interactions between melanophores and the lateral lines that generate stripes in the salamander *Ambystoma tigrinum tigrinum* (Ambystomatidae). *Dev. Biol.* **175**: 282-300.

PARICHY, D. M. 1996c. Pigment pattern of larval salamanders (Ambystomatidae, Salamandridae): The role of lateral line sensory system and the evolution of pattern-forming mechanisms. *Dev. Biol.* **175**: 265-282.

PARICHY, D. M. & R. H. KAPLAN. 1992. Maternal effects on offspring growth and development denpend on environmental quality in the frog *Bombina orientalis*. *Oecologia* **91**: 579-586.

PARKER, H. W. & E. R. DUNN. 1964. Dentitional metamorphosis in the Amphibia. *Copeia* **1964** (**1**): 75-86.

PASTEUR, N., G. PASTEUR, F. BONHOMME, J. CATALAN & J. BRITTON-DAVIDIAN. 1987. Manuel Technique de Génétique par Electrophorèse de Protéines. Coll. Techniques et Documentation. Lavoisier, Paris.

PATTON, J. C. & J. C. AVISE. 1983. An empirical evaluation of qualitative Hennigan analyses of protein electrophoretic data. *J. Mol. Evol.* **19**: 244-254.

PEAKALL, R. & P. E. SMOUSE. 2001. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/

PETRANKA, J. W., J. J. JUST & E. C. CRAWFORD. 1982. Hatching of amphibian embryos: the physiological trigger. *Science* **217**: 257-259.

PETRANKA, J. W. & A. SIH. 1987. Habitat duration, lenght of larval period and the evolution of a complex life cycle of a salamander, *Ambystoma texanum. Evolution* **41**: 1347-1356.

PIGLIUCCI, M. 1996. How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and viceversa). *TREE* **11** (**4**): 168-173.

POSADA, D. & K. A. CRANDALL. 1998. Model test: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.

POSADA, D. & K. A. CRANDALL. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *TREE* **16** (**1**): 37-45.

POSADA, D., K. A. CRANDALL & A. R. TEMPLETON. 2000. GeoDis: a program for the nested cladistic analysis of the geographic distribution of genetic haplotpes. *Mol. Ecol.* **9**: 487-488.

QUALLS, C. P., R. SHINE, S. C. DONNELLAN & M. HUTCHINSON. 1995. The evolution of viviparity within the Australian scindid lizard *Lerista bouganvillii. J. Zool.* **237**: 13-26.

RAFF, R. A & G. A. WRAY. 1989. Heterochrony: developmental mechanisms and evolutionary results. *J. Evol. Biol.* **2**: 409-434.

REILLY S. M., E. O. WILEY & D. J. MEINHARDT. 1997. An integrative approach to heterochrony: the distinction between interspecific and intraspecific phenomena. *Biol. J. Linn. Soc.* **60**: 119-143.

REQUES, R. & M. TEJEDO. 1996. Intraspecific aggressive behaviour in fire salamander larvae (*Salamandra salamandra*): the effects of density and body size. *Herpetol. J.* **6**: 15-19.

RICE, S. H. 1997. The analysis of ontogenetic trajectories: when a change in size or shape is not heterocrony. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 907-912.

RICHARDSON, M. K. 1995. Heterochrony and the phylotypic period. *Dev. Biol.* **172**: 412-421.

RICHARDSON, J. M. L. 2001. The relative roles of adaptation and phylogeny in dermination of larval traits in diversifying anuran lineages. *Am. Nat.* **157 (3)**: 282-299.

RIVERA, X., J. G. SIMÓN & J. A. MELERO. 1999. Observaciones en el ciclo larvario de *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758), en una población de Badalona (Catalunya). *Bull. Soc. Cat. Herp.* **14**: 62-69.

ROACH, D. A. & R. D. WULFF. 1994. Matenal effects in plants. *Q. Rev. Biol.* **18**: 209-235.

ROE, B. A., D. P. MA, R. K. WILSON & J.-H. WONG. 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* **260** (**17**): 9759-9774.

ROFF, D. A. 1997. Evolutionary Quantitative Genetics. Chapman and Hall, New York.

ROGERS, J. S. 1984. Deriving phylogenetic trees from allelic frequencies. *Syst. Zool.* **33**: 52-63.

ROGERS, J. S. 1986. Deriving phylogenetic trees from alleles frequencies: a comparison of nine genetic distances. *Syst. Zool.* **35**: 297-310.

ROHLF, R. J. 1993. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.8. Setauket, New York.

ROSAS, A. 1989. Paleontología, ontogenia y heterocronía. En: CSIC (eds.), Paleontología, pp. 83-108. CSIC, Madrid.

ROSAS, A. & A. D. BUSCALIONI. 1997. Paleobiología: un programa de investigación en marcha. *Rev. Esp. Paleontol.* **12** (**1**): 23-42.

ROSE, M. R. 1982. Antagonistic pleiotropy, dominance, and the genetic variation. *Heredity* **48**: 63-78.

RUEDI, M., M. F. SMITH & J. L. PATTON. 1997. Phylogenetic evidence of mitochondrial DNA introgression among pocket gophers in New Mexico (family Geomidae). *Mol. Ecol.* **6**: 453-462.

SAITOU, N. & M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

SALVADOR, A. & M. GARCÍA-PARÍS. 2001. Anfibios Españoles. Identificación, Historia Natural y Distribución. Canseco Editores, S. L. Talavera de la reina, España.

SAS INSTITUTE, INC. 1990. SAS/STAT User´s Guide, Version 6, 4th Edition, Volume 2. SAS Institute Inc. 846 pp, Cary, NC.

SAVI, P. 1838. Descrizione della *Salamandra corsica*, e della *Megapterna montana* nuovi animali della famiglia dei Batrachii. *Nuovo G. Lett. (Pisa)* **37, 102**: 208-217.

SCHLICHTING, C. D. & M. PIGLIUCCI. 1998. Phenotypic Evolution: a Reaction Norm Perspective. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachussetts.

SCHREIBER, E. 1912. Herpetologia Europaea. (2º ed.) Fischer, Jena. 1-960.

SEMLITSCH, R. D. 1993. Adaptive genetic variation in growth and development of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolution* **47**: 1805-1818.

SEMLITSCH, R. D. & J. W. GIBBONS. 1990. Effects of egg size on success of larval salamanders in complex aquatic environments. *Ecology* **71**: 1789-1795.

SEMLITSCH, R. D. & S. SCHMIEDEHAUSEN. 1994. Parental contributions to variation in hatchling size and its relationship to growth and metamorphosis in tadpoles of *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. *Copeia* **1994**: 406-412.

SEMLITSCH, R. D., D. E. SCOTT & J. H. K PECHMANN. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* **69**: 184-192.

SEOANE, V. L. 1884. Identidads de *Lacerta schreiberi* (Bedriaga) y *Lacerta viridis* var. *gadowii* (Boulenger) e investigaciones herpetológicas en Galicia. La Coruña.

SESSIONS, S. K., H. C. MACGREGOR, M. SCHMID & T. HAAF. 1988. Cytology, embryology, and evolution of the developmental arrest syndrome in newt of the genus *Triturus* (Caudata: Salamandridae). *J. Exp. Zool.* **248**: 321-334.

SHAW R. G. 1987. Maximum-likelihood approaches applied to quantitative genetics of natural populations. *Evolution* **41**: 812-826.

SHAW, R. G. & D. L. BYERS. 1998. Genetics of maternal and paternal effects. En: Mousseau, T. A. & C. W. Fox (eds.), Maternal Effects as Adaptations, pp. 97-111. Oxford University Press, New York.

SHAW R.G. & F. H. SHAW. 1992. Quercus: programs for quantitative genetic analysis using maximum likelihood. Published electronically on the Internet, available directly from the authors or via anonymous ftp from ftp://ftp.bio.indiana.edu/ directory path biology/quantgen/quercus.

SHINE, R. 1985. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. En: Gans, C. y F. Billet (eds.), Development B, Vol. 15 of Biology of the Reptilia pp 605-694. Wiley, New York.

SHINE, R. 1995. A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *Am. Nat.* **145** (**5**): 809-823.

SHINE, R. 2002. Reconstructing an adaptationist scenario: what selective forces favor the evolution of viviparity in montane reptiles? *Am. Nat.* **160** (**5**): 582-593.

SINERVO B. & S. C. ADOLPH. 1989. Thermal sensitivity of growth rate in hatchling *Sceloporus* lizards: environmental, behavioral and genetic aspects. *Oecologia* **78**: 411-419.

SMITH, K. K. 2001. Heterochrony revisited: the evolution of developmental sequences. *Biol. J. Linn. Soc.* **73**: 169-186.

SMITH, S. A. & R. SHINE. 1997. Intraspecific variation in reproductive mode within the Scindid lizard *Saiphos equalis. Austr. J. Zool.* **45**: 435-445.

SMOUSE, P. E., J. C. LONG & R. R. SOKAL. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test and matrix correspondence. *Syst. Zool.* **35** (**4**): 627-632.

SNEATH, P. H. A. & R. R. SOKAL. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco, W. H. Freeman.

SOLE-CAVA, A. M., C. A. M. RUSSO, M. E. ARAUJO & J. P. THORPE. 1994. Cladistic and phenetic analysis of allozyme family for nine species of sea anemone of the family Actinidae (Cnidaria : Anthozoa). *Biol. J. Linn. Soc.* **52**: 225-239.

STATSOFT INC.1999. STATISTICA for Windows, Computer Program Manual. Tulsa, USA.

STEARNS, S. C. 1992. The Evolution of Life Histories. Oxford Univesity Press, New York.

STEARNS, S. C. 2000. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften* **87**: 476-486.

STEINDACHNER, F. 1891. Über einige neue und seltene Reptilien- und Amphibien-Arten. *SB. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Cl., Wien* **100**: 298-314.

STEINFARTZ, S., M. VEITH & D. TAUTZ. 2000. Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra. Mol. Ecol.* **9**: 397-410.

STRAUSS, R. E. 1990. Heterochronic variation in the developmental timing of cranial ossification in Poeciliid fishes (Cyprinodontiformes). *Evolution* **48**: 1607-1618.

SWOFFORD, D. L. 2000. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Beta Version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, MA.

SWOFFORD, D. L. & S. H. BERLOCHER. 1987. Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Syst. Zool.* **36**: 293-325.

SWOFFORD, D. L. & R. B. SELANDER. 1989. BIOSYS-1: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7, Illinois.

SWOFFORD, D. L., G. J. OLSEN, P. J. WADDELL & D. M. HILLIS. 1996. Phylogeny Inference. En: D. M. Hillis, C. Moritz, y B Mable (eds.), Molecular Systematics, pp. 407-514. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachussetts, USA.

TAN, A.-M. & D. WAKE. 1995. MtDNA phylogeography of the Californian newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae). *Mol Phyl. Evol.* **4** (**4**): 383-394.

TARKHNISHVILI, D. N. & L. A. SERBINOVA. 1993. The ecology of the Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*, Waga) in a local population. *Asiat. Herpetol. Res.* **5**: 147-165.

TEJEDO, M. 1992. Absence of the trade-off between size and number of offspring in the naterjack toad (*Bufo calamita*). *Oecologia* **90**: 294-296.

TEJEDO, M. & R. REQUES. 1992. Effects of egg size and density on metamorphic traits in tadpoles of the natterjack toad (*Bufo calamita*). *J. Herpetol* **26**: 146-152.

TEMPLETON, A. R., K. A. CRANDALL & C. F. SING. 1992. A cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**: 619-633.

TEMPLETON, A. R., E. ROUTMAN & C. A. PHILLIPS. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum. Genetics* **140**: 767-782.

TEMPLETON, A. R. & C. F. SING. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* **134**: 659-669.

THIESMEIER, B. 1990. Untersuchungen zur Phänologie und Populationsdynamik des Feuersalamanders (*Salamandra salamandra terrestris* Lacépède, 1778) im Niederbergischen Land (BRD). *Zool Jb Syst* **117**: 331-353.

THIESMEIER, B. 1992. Ekologie des Feuersalamanders. (Okologie; Bd. 6). Essen, Westarp Wissenschaften.

THIESMEIER, B. & K. HAKER. 1990. *Salamandra salamandra bernardezi* Wolterstorff 1928 aus Oviedo, Spanien, nebst Bemerkungen zur Viviparie in der Gattum *Salamandra. Salamandra* **26**: 140-154.

THIESMEIER, B., W. SAUER & T. MUTZ. 1994. Birth and dates of birth of offspring of *Salamandra salamandra bernardezi* from Oviedo. *Mertensiella* **4**: 347-354.

THOMPSON, J. D. 1991. Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. *TREE* **6**: 246-249.

TILLEY, S. G. & J. BERNARDO. 1993. Life-history evolution in plethodontid salamanders. *Herpetologica.* **49**: 154-163.

TITUS, T. A. & A. LARSON. 1995. A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary radiation of the salamander family Salamandridae. *Syst. Biol.* **44**: 125-151.

TRAVIS, J., S. B. EMERSON & M. BLOUIN. 1987 A quantitative genetic analysis of larval life-history traits in *Hyla crucifer. Evolution* **41**: 145-156.

TREVISAN, P. 1982. A new subspecies of alpine salamander. *Boll. Zool.* **49** (**3-4**): 235-239.

UZQUIANO, P. 1992. The late glacial/postglacial transition in the central Cantabrian Cordillera (Asturias and Cantabria, Spain) base on charcoal analysis. *Palaios* **7**: 540-547.

UZQUIANO, P. 1995. La disparition de *Picea* à la fin du Pléistocène supérieur en région cantabrique d'après l'anthracoanalyse: déterminisme climatique et anthropique. *C. R. Acad. Sci. Paris, série IIa* **321**: 545-551.

VAN DONGEN, S. 1995. How should we bootstrap allozyme data? *Heredity* **74 (4)**: 445-447.

VAN VALEN, L. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory* **1**: 1-30.

VEITH, M., S. STEINFARTZ, R. ZARDOYA, A. SEITZ & A. MEYER. 1998. A molecular phylogeny of 'true' salamanders (family Salamandridae) and the evolution of terrestriality of reproductive modes. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **36**: 7-16.

VIA, S. 1984. The quantitative genetics of polyphagy in an insect herbivore. II. Genetic correlations in larval performance within and across host plants. *Evolution* **38**: 896-905.

VIA, S. 1987. Genetic constraints on the evolution of phenotypic plasticity. En: Loeschcke V. (ed), Genetic constraints on adaptive evolution, pp. 47-71. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

VIA S & R. LANDE. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* **39**: 505-522.

VON BAER, K. E. 1828. Entwicklungsgeschichte der Thiere, Beobachtung und Reflexion. Borntäger, Königsberg.

WADE, M. J. 1998. The evolutionary genetics of matenal effects. En: Mousseau, T. A. y C. W. Fox (eds.), Maternal effects as adaptations, pp 5-21. New York, Oxford Univesity Press.

WAGA. 1876. Nouvelle espèce de Salamandride. *Rev. Mag. Zool pure appl.*, Paris **3-4**: 326-328.

WÄGELE, J. W. 1994. Review of methodological problems of 'Computer cladistics' exemplified with a case study on isopod phylogeny (Crustacea: Isopoda). *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch* **32**: 81-107.

WAKE, D. B. 1982. Functional and developmental constraints and opportunities in the evolution of feeding systems in urodeles. En: D. Mossalowski y G. Roth (eds.), Environmental Adaptation and Evolution, a Theoretical and Empirical Approach, pp. 51-66. G. Fisher, Stuttgart.

WAKE, D. B. & N. ÖZETI. 1969. Evolutionary relationships in the family Salamandridae. *Copeia* **1969**: 124-137.

WAKE, D. B. & G. ROTH. 1989. The linkage between ontogeny and phylogeny in the evolution of complex systems. En D. B. Wake y G. Roth (eds.), Complex organismal functions: integration and evolution in vertebrates, pp 361-377. New York. Jon Wiley y Sons Ltd.

WAKE, M. H. 1976. The development and replacement of teeth in viviparous caecilians. *J. Morph.* **148** (**1**): 33-64.

WAKE, M. H. 1982. Diversity within a framework of constraints: reproductives modes in amphibians. En: D. Mossalowski and G. Roth (eds.), Environmental adaptation and evolution, a theoretical and empirical approach, pp. 87-106. G. Fisher, Stuttgart.

WAKE, M. H. 1989. Phylogenesis of direct development and viviparity in vertebrates. En D. B. Wake y G. Roth (eds.), Complex Organismal functions: integration and evolution in vertebrates, pp. 235-250. John Wiley y Sons Ltd., New York.

WAKE, M. H. 1992. Evolutionary scenarios, homology and convergence of structural specializations for vertebrate viviparity. *Amer. Zool.* **32**: 256-263.

WAKE, M. H. 1993. Evolution of oviductal gestation in Amphibians. *J. Exp. Zool.* **266**: 394-413.

WARBURG, M. R. 1992. Breeding patterns in a fringe population of fire salamanders, *Salamandra salamandra. Herpetol J.* **2**: 54-58.

WARBURG, M. R. 1997. Ecophysiology of amphibians inhabiting xeric environments. Springer Verlag, Berlin.

WASSERSUG, R. & K. HOFF. 1982. Developmental changes in the orientation of the anuran jaw suspension: a preliminary exploration into the evolution of anuran metamorphosis. En M. K. Hecht, B. Wallace and G. T. Prance (eds.), Evolutionary Biology, pp. 223-246. Plenum Press, New York.

WEISROCK, D. W., J. R. MACEY, I. H. UGURTAS, A. LARSON & R. P. PAPENFUSS. 2001. Molecular phylogenetics and historical biogeography among Salamandrids of the "true" salamander clade: rapid branching of numerous highly divergent lineages in *Mertensiella luschani* associated with the rise of Anatolia. *Mol. Phyl. Evol.* **18 (3)**: 434-448.

WEST-EBERHARD, M. J. 1989. Phenotypic plasticity and the origin of diversity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **20**: 249-278.

WIENS, J. J. 1995. Polymorphic characters in phylogenetic systematics. *Syst. Biol.* **44**: 482-500.

WIENS, J. J. 1999. Polymorphism in systematics and comparative biology. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **30**: 327-362.

WIENS, J. J. 2000. Reconstructing phylogenies from allozyme data: comparing method performance with congruence. *Biol J. Linn. Soc.* **70**: 613-632.

WILBUR, H. M. & J. P. COLLINS. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* **182**: 1305-1314.

WILLHAM, R. L. 1963. The covariance between relatives for characters composed of components contributed by related individuals. *Biometrics* **19**: 18-27.

WOLTERSTORFF, W. 1928. Vollmolchgebarende Feuersalamander aus Oviedo. *Blät. Aquar. Terrar. Kunde* **39**: 132-133.

WOLTERSTORFF, W. 1934. Über *Salamandra maculosa* Laur. (= *salamandra* L.) *molleri* und ein neue Form, subsp *bejarae. Blät. Aquar. Terrar. Kunde* **43**: 41-43.

WOURMS, J. P. 1981. Viviparity: the maternal-fetal relationship in fishes. *Amer. Zool.* **21**: 473-515.

WOURMS, J. P. & I. A. CALLARD. 1992. A retrospect to the symposium on evolution of viviparity in vertebrates. *Amer. Zool.* **32**: 251-255.

WRAY, G. A. & D. R. MCCLADE. 1989. Molecular heterochronies and heterotopies in early echinoid development. *Evolution* **43**: 803-813.

WRAY, G. A. & R. A. RAFF. 1991. The evolution of developmental strategies in marine invertebrates. *TREE* **6** (**2**): 45-50.

WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**: 114-138.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol.4: Variabilty Within and Between Populations. Univ. of Chicago Press, Chicago.

WUNDERER, H. 1910. Die Entwicklung der äubern Körperform des Alpensalamanders (*Salamandra atra* Laur.). *Zool. Jahrb. (Anat. Ontog. Tiere)* **29**: 367-414.

ZAKRZEWSKI, M. 1987. Effect of definite temperature ranges on development, metamorphosis and procreation of the spotted salamander larvae, *Salamandra salamandra* (L.). *Acta Biol. Crac., Zool* **29**: 77-83.

ZHANG, D.-X. & G. M. HEWITT. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *TREE* **11**: 247-251.

ZOUROS, E., A. O. BALL, C. SAAVEDRA & K. R. FREEMAN. 1994. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7463-7467.