

Nuevo estatus taxonómico para las poblaciones ibero-mediterráneas de *Alytes obstetricans* (Anura: Discoglossidae)

MARIO GARCÍA-PARÍS & IÑIGO MARTÍNEZ-SOLANO

*Museo Nacional de Ciencias Naturales, C.S.I.C.
c/ José Gutiérrez Abascal, 2. 28006. Madrid, España.*

Resumen: Las poblaciones mediterráneas de *Alytes obstetricans* antes incluidas dentro de *A. o. boscai* se separan taxonómicamente como una subespecie nueva, *Alytes obstetricans pertinax n. ssp.*, a partir de evidencia genética (electroforesis de proteínas, ADN mitocondrial) y morfológica. Los ejemplares de la nueva subespecie se caracterizan morfológicamente por presentar cabezas más alargadas, aspecto general menos robusto y patrones de coloración más uniformes, menos contrastados, con las manchas oscuras dorsales de menor tamaño y generalmente menos fusionadas, que los ejemplares típicos de la subespecie *A. o. boscai*. Las larvas se diferencian por su patrón de coloración, más parecido al de la especie *Alytes dickhilleni* que al de *A. o. boscai*. Se evalúa de forma preliminar el estado de conservación de las poblaciones de esta nueva subespecie, que debe considerarse seriamente amenazada al menos en la parte occidental de su área de distribución, especialmente en Madrid, Toledo y Albacete.

Palabras clave: Taxonomía, Sistemática, Anura, Discoglossidae, *Alytes obstetricans*, España.

Abstract: New taxonomic status for the Ibero-Mediterranean populations of *Alytes obstetricans* (Anura: Discoglossidae).- Mediterranean populations of *Alytes obstetricans* formerly included in the subspecies *A. o. boscai* are described as a new subspecies, *Alytes obstetricans pertinax n. ssp.*, based on genetic (protein electrophoresis, mitochondrial DNA) and morphological evidence. Morphologically they are characterized by more elongated head, less robust body, and uniform coloration patterns when compared with *A. o. boscai* individuals, including less contrasted dorsal coloration, dark dorsal marks smaller, usually not fused to each other. Larvae differ by their color pattern, similar to the pattern characteristic of *Alytes dickhilleni* rather than to the typical pattern of *A. o. boscai*. A preliminary evaluation of the conservation status of this new subspecies is taken. It should be considered in serious risk of extinction at least at the occidental part of their distribution range, particularly in the provinces of Madrid, Toledo and Albacete.

Key words: Taxonomy, Systematics, Anura, Discoglossidae, *Alytes obstetricans*, Spain

INTRODUCCIÓN

El estatus taxonómico de las poblaciones ibéricas del género *Alytes* ha sufrido numerosos cambios a raíz de análisis morfológicos y de electroforesis de proteínas (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995). Estos análisis concluyeron con la descripción del sapo partero bético, *A. dickhilleni* Arntzen & García-París, 1995, especie filogenéticamente hermana del ferreret mallorquín, *A. muletensis* Sanchiz & Adrover, 1977, y con la fragmentación de las poblaciones de *A. obstetricans* en tres subespecies: *A. o. obstetricans* Laurenti, 1768, *A. o. boscai* Lataste, 1849 y *A. o. almogavarii* Arntzen & García-París, 1995.

Estas tres subespecies ibéricas de *A. obstetricans* poseen áreas de distribución geográfica mal delimitadas, ya que existen amplias zonas de transición y posiblemente hibridación entre ellas que todavía no han sido definidas adecuadamente (GARCÍA-PARÍS, 1995). La subespecie septentrional *A. o. obstetricans* se extiende por parte de Europa Occidental y a lo largo de la Cornisa Cantábrica; *A. o. almogavarii* ocupa toda Cataluña, posiblemente todo Aragón y una amplia franja del norte de Castilla - La Mancha, en la provincia de Guadalajara; *A. o. boscai* se consideraba extendido por la mayor parte del norte y centro de Portugal, Galicia, áreas occidentales de Castilla-León, y en una amplia zona mediterránea extendida

desde la Cuenca del Ebro hasta Murcia y zonas orientales de Castilla-La Mancha (Figura 1). Aunque estas subespecies son fenotípicamente diferenciables en las zonas centrales de su distribución, existen numerosas áreas donde la diferenciación externa no es clara (Pirineos occidentales, Submeseta norte, Sistema Ibérico septentrional) y donde posiblemente ocurren o han ocurrido procesos de contacto e hibridación, como los ya señalados entre *A. o. almogavarii* y *A. o. obstetricans* en los Pirineos centrales (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995), o entre *A. o. almogavarii* y *A. o. boscai* en la Sierra de Guadarrama (GARCÍA-PARÍS, 1995).

ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS (1995) señalaron que la diferenciación morfológica alcanzada entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas previamente incluidas en *A. o. boscai* era elevada y que su diferenciación genética podría considerarse del mismo orden que la existente entre las otras subespecies. Estos autores deci-

dieron conservar ambos núcleos como una única entidad taxonómica, ya que solamente estudiaron poblaciones situadas en los extremos de la distribución, aparentemente continua, de esta subespecie (Pontevedra y Castellón). Sin embargo, un estudio posterior (GARCÍA-PARÍS, 1995), mostró que no existe contacto geográfico entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas de *A. o. boscai*, ya que *A. o. almogavarii* penetra hasta el Sistema Central separando los dos núcleos poblacionales. Esta nueva situación, que no permite considerar los morfotipos de la región atlántica y de la mediterránea como los extremos de la variación clinal de *A. o. boscai*, requiere una nueva evaluación del estatus taxonómico de estas poblaciones.

En este trabajo se describen las poblaciones de *A. obstetricans* del centro y este peninsular, como una subespecie nueva, *A. o. pertinax n. ssp.* y se discuten los datos morfológicos y genéticos que justifican tal decisión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Osteología

En el estudio osteológico se estudiaron 17 ejemplares de *Alytes obstetricans* transparentados y teñidos según protocolos de doble tinción cartílago-hueso (WASSERSUG, 1976) de la colección del Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN), Madrid. Los especímenes correspondientes a *A. o. pertinax*, procedentes de Valencia (Algar de Palancia, N=3, MNCN 20882-83, MNCN 20885) y Castellón (Caudiel y Benicassim, N=4, MNCN 20858-20861), se compararon con ejemplares de *A. o. boscai* de Ávila (San Martín del Pimpollar, N=3, MNCN 20870-72), La Coruña (Arteixo, N=1, MNCN 20852) y Pontevedra (Tuy, N=1, MNCN 19895). Además se utilizaron cinco ejemplares juveniles transparentados y teñidos de *A. o. pertinax* de Caudiel, Castellón (MNCN 20853-54, 20856-57 y 20862) para detectar posibles cambios ontogénicos en los patrones de osificación de esta subespecie. Tras un análisis preliminar, se midió en los

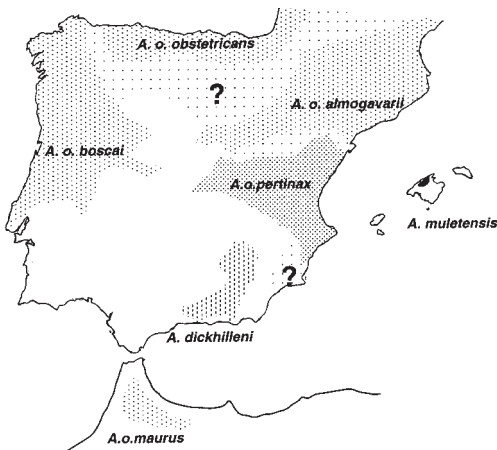


Figura 1.- Mapa de distribución de las subespecies de *Alytes obstetricans* en la Península Ibérica. Las zonas señaladas con interrogación corresponden a áreas donde se han detectado procesos de hibridación entre subespecies o para las que no existen datos genéticos.
Figure 1.- Distribution map of the subspecies of *Alytes obstetricans* in the Iberian Peninsula. Areas with question marks represent hybridization zones between subspecies or zones for which no genetic data are available.

Tabla 1: Frecuencias alélicas de 5 loci no estudiados previamente (Arntzen & García-París, 1995), estudiados en una población de *Alytes obstetricans boscai* (Bayona, Pontevedra) y una población de *A. o. pertinax* (Caudiel y Benicassim, Castellón)

Table 1: Allele frequencies for 5 gene loci not studied previously (Arntzen & García-París, 1995), surveyed in one population of *Alytes obstetricans boscai* (Bayona, Pontevedra) and one population of *A. o. pertinax* (Caudiel and Benicassim, Castellón)

		<i>A. o. pertinax</i>	<i>A. o. boscai</i>
N		2	5
<i>Ddh-1</i>	a	50	
		50	40
	c		60
N		2	5
<i>Ddh-2</i>	a	100	100
N		2	5
<i>Est-1</i>	a		25
	b		75
	c	100	
N		2	5
<i>Fdh</i>	a		100
	b	100	
N		2	5
<i>Gda</i>	a	100	100

adultos transparentados y teñidos, la relación longitud de la cabeza/anchura de la cabeza por medio del trazado de un triángulo cuya base es una línea que une los dos puntos más posteriores de los tímpanos, la altura es la línea perpendicular a ésta que pasa por el punto más anterior del rostro del animal y los lados son las líneas que, partiendo de este punto y pasando por los puntos de los tímpanos más alejados del eje medial del cuerpo, cortan la base. Para cuantificar la significación de las diferencias se empleó la prueba de la U de Mann-Whitney.

Morfología externa

Se utilizaron 13 medidas externas, ya usadas en un trabajo anterior (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995), para generar una función dis-

criminante que separase los dos grupos de poblaciones. Las medidas se tomaron sobre ejemplares vivos y los datos se presentaron en el trabajo citado como poblaciones de “Galicia” (*A. o. boscai*) y “Valencia” (*A. o. pertinax*) (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995: Tabla 5). Las medidas fueron transformadas logarítmicamente para el análisis. Una vez obtenida la función discriminante se utilizó para clasificar dos ejemplares del Royal Museum de Bruselas (I.G. 4413 Reg. 167B) que podrían corresponder a la serie típica de *A. o. boscai*.

Electroforesis de proteínas

Los tejidos utilizados para la electroforesis de proteínas, correspondientes a 4 ejemplares de *A. o. pertinax* de Castellón (Caudiel: MNCN sin catalogar, y Benicassim: MNCN 16767 y 16773) y a 6 ejemplares de *A. o. boscai* de Pontevedra (Tuy: MNCN 16780 y sin catalogar), proceden del material utilizado en un trabajo anterior (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995), donde se describe el método, los sistemas empleados y loci estudiados a excepción de *Fadh* (Formaldehído hidrogenasa, EC 1.2.1.1., Tris-Citrato pH 8), *Ddh-1* y *Ddh-2* (Dihidropoliámida deshidrogenasa, EC 1.8.1.4., Tris-citrato pH=8), *Est-1* (Esterasa, EC 3.1.1.1., Hidróxido de litio Tris-citrato pH=8) y *Gda* (Guanina desaminasa, EC 3.5.4.3, Tris-citrato pH=8), que fueron analizados posteriormente. Las frecuencias alélicas correspondientes a 31 loci se presentaron en ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS (1995: Tabla 3), y las correspondientes a los 5 nuevos loci analizados para este estudio se presentan en la Tabla 1. Una pequeña muestra adicional de ejemplares procedentes de Valencia (Algar de Palancia, N=3) y Alicante (Alcoy, N=2; Petrer, N=2) fueron analizados exclusivamente para los loci diagnóstico.

Secuenciación de ADN

Se obtuvieron secuencias de 385 pares de bases del gen del citocromo b del ADN mitocondrial de 3 ejemplares de *Alytes obstetricans*. Los ejemplares utilizados proceden de

Tabla 2: Porcentajes de clasificación correcta obtenidos por la función discriminante. Grupo 1 = *A. o. pertinax*; Grupo 2 = *A. o. boscai*.

Table 2: Correct classification percentages of the discriminant function. Group 1 = *A. o. pertinax*; Group 2 = *A. o. boscai*.

Grupo	Casos	Porcentaje de clasificación	
		1	2
1	30	28 (93.3%)	2 (6.7 %)
2	14	2 (14.3%)	12 (85.7%)
Porcentaje total clasificado correctamente		90.91 %	

Benicassim, Castellón (*A. o. pertinax*) y de Tuy, Pontevedra y A Coruña, A Coruña (*A. o. boscai*). Las secuencias se han depositado en el GenBank bajo los "accession numbers": AY046078-080. Para la extracción, PCR y secuenciación se han seguido los pasos y condiciones, incluidas las secuencias cebadoras, descritos en GARCÍA-PARÍS & JOCKUSCH (1999), donde ya fueron publicadas una secuencia de *Alytes muletensis* y otra de *A. o. obstetricans*. Las secuencias se leyeron a partir de las dos cadenas y se alinearon entre sí mediante el programa Sequence Navigator™ versión 1.0.1 (Applied Biosystems). La divergencia entre secuencias fue estimada utilizando la distancia "Kimura 2-parameter" (K2p) (KIMURA, 1980; obtenida usando el programa PAUP* 4.0b3, D. Swofford, Smithsonian Institution) ya que tiene en cuenta el efecto de cambios múltiples en una misma posición.

Tabla 3: Media y desviación típica de la variable "Relación longitud de la cabeza / anchura de la cabeza" en cada subespecie, separado por sexos. N = número de ejemplares examinados.

Table 3: Mean and standard deviation of the variable "Head length / Head width" for each subspecies, separated for both sexes. N = number of specimens examined.

Taxón	Sexo	N	Media	D. Típica
<i>A. o. boscai</i>	m	2	0.5184	0.034
<i>A. o. boscai</i>	h	3	0.6503	0.029
<i>A. o. boscai</i>	m + h	5	0.5975	0.077
<i>A. o. pertinax</i>	m	3	0.6319	0.023
<i>A. o. pertinax</i>	h	4	0.6449	0.018
<i>A. o. pertinax</i>	m + h	7	0.6375	0.021

Distribución geográfica

Además del material citado se revisaron para la realización de las descripciones externas y para la delimitación del área de distribución geográfica ejemplares adultos y larvas de las siguientes localidades:

A. o. boscai: ESPAÑA: **Avila:** Mijares (MNCN 21121-24, larvas); Venta Rasquilla, Gredos (MNCN 20786 larvas); San Martín del Pimpollar (MNCN 13133-34; 11369); Venta del Obispo (20870-73); Hoyos del Espino (MNCN 26239-41). **Cáceres:** Descargamaría (MNCN 15361); Lanchares, Valencia de Alcántara (MNCN 24086); Bosque de San Ciprián, Sierra de Gata (MNCN 26273 larvas). **A Coruña:** Arteixo (MNCN 20852); A Coruña (MNCN 155-58); Río Tambre, Puente Carreira, Frades (MNCN 26367 larvas); Río Eume, Puentes de García Rodríguez (MNCN 26368 larva). **Lugo:** T. de Fucio (MNCN 26369 larvas). **Madrid:** El Escorial (MNCN 170). **Ourense:** Chantada (MNCN 11268); Río Limia, Quintela (MNCN 26274 larvas); Cabeza Grande de Manzaneda (MNCN 26370 larvas). **Pontevedra:** Monte Aloya, Tuy (MNCN 19895-99); Bueu, Forqueros (MNCN 26371 larvas); Monte Castelo, Cangas (MNCN 26372 larvas); Rodeiro (MNCN 26373-75 larvas); Sangenjo (MNCN 23376 larvas). **Salamanca:** Robleda (MNCN 160-67). **PORTUGAL:** Serra Estrela (MNCN 314-339; 26138 larvas); Castelo Branco, Casal do Frade (MNCN 15212-13; MNCN 15185-209).

A. o. pertinax: ESPAÑA: **Albacete:** La Tola, Municipio de Casas Ibáñez (MNCN 23918, holotipo); Higuera (MNCN 2604). **Castellón:** Benicasim (MNCN 16767; 16773; 20038-39; 23462-63; 24470-71; 24090 larvas); Caudiel (20853-69; 23457-61); Chodos (23511, larvas); Navajas (MNCN 147). **Cuenca:** Central Hidráulica El Batán (MNCN 26226); Villanueva de los Escuderos (MNCN 26228-32; 26227 larvas). **Guadalajara:** Alhóndiga (MNCN 20941); Ciruelas (MNCN 20942-49); Archilla (MNCN 24092 larva); Cogolludo (MNCN 174-75); Peralejo de las Truchas (MNCN 26234 larvas; 26235-36); Renales (MNCN 26237 larvas); Valdepeñas de la Sierra (MNCN 26238). **Madrid:** Villar del Olmo (MNCN 24133-35); Carretera Loeches-Torrejón (MNCN 26342); Tielmes (MNCN 23919-23922, paratipos). **Toledo:** Lillo (MNCN 20701). **Valencia:** Algar de Palancia (MNCN 20881-85; 23470 larvas; 23471-77; 24087-88; 24089 larvas); Xátiva (MNCN 750-54, paratipos); Valencia (MNCN 146; 172-73, paratipos); Cortes de Pallars (MNCN 26366 larvas); Dos Aguas (MNCN 26275).

Además se han examinado ejemplares vivos que se liberaron in situ de las siguientes localidades:

Albacete: Alpera, Casas Ibáñez, Las Fuentes, Higuera; **Alicante:** Alcoi, Petrer; **Madrid:** Colmenar de Oreja, Chinchón, Olmeda de Fuentes, Villar del Olmo; **Cuenca:** Buenahe de la Sierra, Cuenca, La Cierva, Mirador de Uña; **Guadalajara:** Mondéjar, Pastrana; **Toledo:** La Guardia.

RESULTADOS

Electroforesis de proteínas

Nueve sistemas enzimáticos mostraron variantes alélicas únicas en las poblaciones de *A. o. boscai* (Pontevedra) y *A. o. pertinax* (Castellón) (Tabla 1; ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995: Tabla 3): *AcpH-2*: En los ejemplares de Castellón aparece en baja frecuencia (25%) una variante lenta exclusiva de estas poblaciones. *Ddh-1*: En los ejemplares de

Castellón aparece una variante rápida, con una frecuencia del 50%, exclusiva de esta población. *Est-1*: Los ejemplares de Castellón se caracterizan por presentar exclusivamente una variante alélica lenta con relación a las presentes en los ejemplares de Pontevedra. *Fdh*: Los ejemplares de Pontevedra se caracterizan por presentar una variante de mayor movilidad característica de estas poblaciones, aunque esta variante aparece también en baja frecuencia en *A. o. almogavarii* (GARCÍA-PARÍS, 1995). *Gpi*: En los ejemplares de Castellón aparece una variante alélica más lenta con frecuencia dominante (62.5%). *Icd-1*: En los ejemplares de Castellón aparece una variante alélica rápida en baja frecuencia (33%), presente también en *A. dickhilleni* (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995). *Mpi-1*: Los ejemplares de Pontevedra se caracterizan por presentar una variante alélica de gran movilidad (30%) y otra muy lenta (40%) en relación con la que aparece en Castellón, aunque ésta aparece también en baja frecuencia en la población de Pontevedra (30%). *Pep (Igg)*: Los ejemplares de Castellón poseen una variante alélica aparentemente fijada. *Sdh-1*: En los ejemplares de Pontevedra aparece en baja frecuencia (8.3%) una variante rápida característica de esta población.

Aunque el número de individuos estudiado es muy bajo y los resultados han de interpretarse consecuentemente, los loci *Est-1*, *Fdh* y *Pep (LGG)* parecen presentar alelos marcadores que permitirían discriminar entre *A. o. pertinax* y *A. o. boscai*. En el análisis electroforético de ejemplares adicionales de Valencia (Algar de Palancia, N=3) y Alicante (Alcoy, N=2; Petrer, N=2) se confirma la presencia de los alelos marcadores correspondientes de *A. o. pertinax* en estas poblaciones.

Secuenciación de ADN

Las secuencias parciales del gen mitocondrial del citocromo b son idénticas en los dos ejemplares examinados de cada población. La divergencia entre las secuencias correspon-

dientes a *A. o. boscai* (La Coruña-Pontevedra) y *A. o. pertinax* (Castellón) es del 1.4% (distancia corregida K2-p = 0.0139), mientras que éstas divergen en un 1.4 % y 0.8% respectivamente respecto a la secuencia publicada de *A. o. obstetricans* (Asturias) (GARCÍA-PARÍS & JOCKUSCH, 1999). La divergencia de estas secuencias con respecto a la de *A. muletensis* es marcada (9.9-10.9%), en consonancia con el estatus específico de esta especie (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1997).

Análisis morfométrico

Se obtuvo una función discriminante (tolerancia mínima = 0.001; significación 0.001) que asigna correctamente el 90.91% de los casos a la subespecie correspondiente. Los estadísticos básicos de las variables empleadas se encuentran en ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS (1995: Tabla 5). Los resultados de la clasificación se muestran en la Tabla 2. Las variables que muestran una mayor significación son: log END ($p < 0.001$); log HLL ($p < 0.005$); log HW ($p < 0.005$); log JL ($p < 0.001$); log ND ($p < 0.005$); log SVL ($p < 0.001$) y log TFL ($p < 0.005$).

Se realizó también un análisis por pasos y se obtuvo una función discriminante que clasifica correctamente un 79,5% de los casos con una única variable, log END (distancia mínima entre el ojo y las narinas transformada logarítmicamente) y muy alta significación ($p < 0.0001$).

Este resultado refleja las diferencias patentes a simple vista en cuanto a la diferenciación morfológica entre las dos subespecies. Mientras que los ejemplares de *A. o. pertinax* presentan cabezas más alargadas, los ejemplares de *A. o. boscai* presentan cabezas más cortas y de aspecto triangular (Figura 2).

Análisis osteológico

A nivel osteológico se constataron las diferencias en la forma de la cabeza que habían sido detectadas con el análisis discriminante, corroborando también las diferencias observadas en vivo. Los machos de *A. o. boscai* se

caracterizan por presentar cabezas con una relación longitud/anchura en torno a 1: 2, que le dan un aspecto más robusto, mientras que los machos de *A. o. pertinax* presentan relaciones del orden de 1.2: 2, es decir, cabezas más alargadas. En la Tabla 3 se muestran los estadísticos básicos de la variable longitud/anchura de la cabeza.

Se comparó también la relación longitud/anchura de los otoccipitales, que es significativamente mayor en los ejemplares de *A. o.*

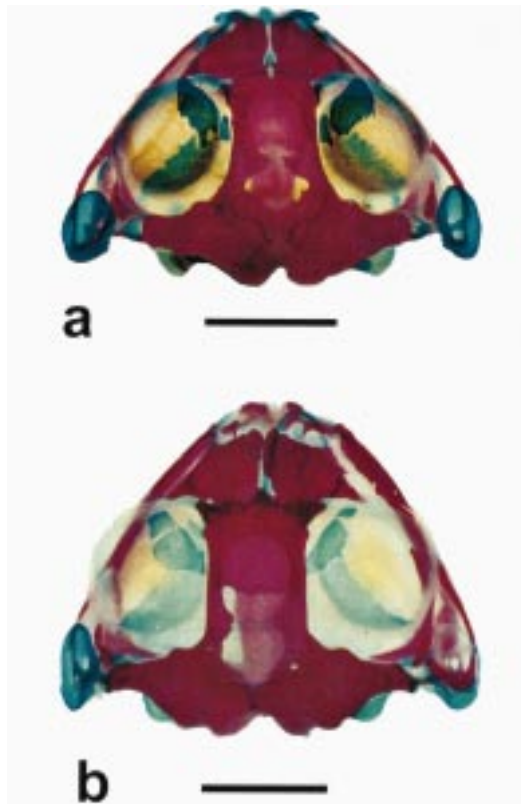


Figura 2.- Vista dorsal del cráneo de ejemplares transparentados y teñidos de *A. o. boscai* (MNCN 20871) (a) y *A. o. pertinax* (MNCN 20885) (b) para comparación de la forma general del cráneo. Barra de escala = 5 mm.

Figure 2.- Dorsal view of cleared and stained specimens of *A. o. boscai* (MNCN 20871) (a) and *A. o. pertinax* (MNCN 20885) (b), for comparison of the general shape of the cranium. Scale bar = 5 mm.

Tabla 4: Estadísticos básicos para tres variables morfométricas obtenidas en cráneos transparentados con doble tinción: LC = Longitud de la cabeza. NL/NW = Relación longitud / anchura de los nasales (promedios del nasal izquierdo y derecho). OL/OW = Relación longitud / anchura de los otoccipitales (promedios del otoccipital izquierdo y derecho); y resultados de la comparación entre *A. o. pertinax* (Grupo 1) y *A. o. boscai* (Grupo 2) (test U de Mann-Witney). N = número de ejemplares examinados, U = U de Mann-Witney; Z = Z de Wilcoxon.

Table 4: Basic statistics for three morphometric variables from cleared and double stained skulls: LC = Head length. NL/NW = Length / width ratio of nasals (left / righth average). OL/OW = Length / width ratio of otoccipitals (left / righth average); and results of the Mann-Witney's test for comparison between *A. o. pertinax* (Group 1) and *A. o. boscai* (Group 2). N= number of specimens examined; U = Mann-Witney's U; Z = Wilcoxon's Z.

	Grupo	N	Media	D. Típica	U	Z	p
LC	1	6	12.69	0.88	18.50	-0.358	n.s.
	2	7	13.36	1.40	0		
NL/NW	1	6	0.90	0.13	18.00	-0.429	n.s.
	2	7	0.85	0.04	0		
OL/OW	1	6	0.60	0.04	0.000	-3.000	<0.005

boscai analizados (Tabla 4). Esta diferencia está relacionada de nuevo con la forma general de la cabeza, más corta en esta subespecie, que en este aspecto se asemeja a *Alytes cisternasii*. Las diferencias encontradas en la relación longitud/anchura de los nasales no son significativas, aunque podemos señalar que en general, los nasales de los ejemplares de *A. o. boscai* examinados poseen una relación longitud/anchura mayor que en *A. o. pertinax*, y por lo tanto presentan una forma más alargada en relación con el eje del cuerpo, cuyo borde posterior cubre en mayor medida el borde anterior del esfenetmoides.

En los ejemplares juveniles de *A. o. pertinax* los bordes posteromediales de los frontoparietales se encuentran separados entre sí, aproximándose uno a otro en la línea media en los ejemplares de mayor talla. En los individuos adultos de *A. o. pertinax* la separación posteromedial de los frontoparietales es mayor que en *A. o. boscai*. Además, en esta última subespecie, los procesos mediales de los frontoparietales, sin llegar a fusionarse, quedan más próximos entre sí que en el caso de *A. o. pertinax*, acentuando la forma de doble fontanela frontoparietal característica de las

especies de *Alytes* (BOULENGER, 1897) y aproximándose a la condición presente en *A. cisternasii* (CLARKE, 1984).

Taxonomía

Alytes obstetricans pertinax n. ssp.

Holotipo: MNCN 23918 (Figura 3 a), ejemplar macho de La Tola, Municipio de Casas Ibáñez, Provincia de Albacete (M. García-París e I. Martínez-Solano leg.; 14-VI-2000) (Figura 4).

Paratipos: MNCN 172-173, 2 ejemplares adultos de Valencia (E. Boscá leg., VI-1907); MNCN 750-754, 5 ejemplares adultos de Xátiva, Valencia (E. Boscá leg., 15-XII-1876); MNCN 24470-71, 2 ejemplares adultos de Barranco de Sta. Águeda, Benicassim, Castellón (M. García-París leg.; 3-III-1990); MNCN 23919-22, 4 ejemplares adultos de Tielmes de Tajuña, Madrid (M. García-París leg.; V-2000); MNCN 23923, 1 ejemplar adulto de Tielmes de Tajuña, Madrid (M. García-París leg.; 31-VIII-2000)

Diagnosis: Subespecie de *Alytes obstetricans* de aspecto relativamente grácil, con cabeza larga y estrecha. Se diferencia de *A. o. obstetricans* por (1) su aspecto general menos ro-

busto, (2) ausencia de verrugas glandulares dorsales, (3) patrón de coloración dorsal característico con manchas pardas pequeñas sobre fondo claro, y ausencia casi total de manchas oscuras gulares y (4) patrón electroforético, incluyendo alelos diagnóstico para el locus *Mpi-1*. Las diferencias con *A. o. almo-gavarii* se centran en (1) su aspecto general menos robusto con cabeza más alargada, (2) patrón de coloración característico mucho menos abigarrado y (3) patrón electroforético que incluye alelos diagnóstico para los loci (α *Gly* y *Me-2*. Las diferencias con *A. o. boscai* se basan en los caracteres anteriormente citados (1) cabeza más larga y aspecto más grácil, (2) patrón de coloración de adultos y larvas característico, (3) alelos diagnóstico para *Est-1*, *Fad* y *Pep* (*LGG*), y en (4) membrana interdigital más corta, sin que tampoco sobrepase el extremo distal de la segunda falange basal del cuarto dedo y (5) en 1.4% de las bases del citocromo b.

Descripción general: Aspecto rechoncho, aunque relativamente grácil y alargado. Cabeza grande y gruesa, muy larga. La cabeza se ensancha progresivamente desde el extremo anterior del hocico hasta la región ocular y desde aquí permanece casi constante hasta su inserción troncal. Morro corto, obtusamente puntiagudo, casi redondeado. Surco naso-lacrimal poco marcado. Prognatismo de la mandíbula superior poco marcado, casi nulo en algunos ejemplares. Pliegue gular patente. Tímpano redondeado. Piel dorsal sin apenas tubérculos ni verrugas, lisa o chagrinada, con puntos glandulares muy escasos en los costados o en la región posterior. Glándulas parotídeas gruesas y bien marcadas, en forma de arco suave que rodea superior y posteriormente al tímpano. Piel ventral lisa, suavemente granular hacia los costados y región posterior. Extremidades relativamente largas. Tres tubérculos palmares; el central menor y en contacto con el exterior; pequeños tubérculos en la base de los dedos poco marcados o ausentes. Dedos anteriores relativamente largos, sin membranas interdigitales. Dedos anteriores de tamaño

decreciente según la relación: 3>4>2>1. Tubérculo metatarsal interno bien marcado, redondeado o ligeramente ovalado; se insinúan tubérculos subarticulares en la base de los dedos internos; escasos gránulos plantares dispersos. Dedos posteriores relativamente largos de aspecto aplastado al presentar un reborde cutáneo que se prolonga en una membrana interdigital corta que no sobrepasa el extremo distal de la segunda falange basal del cuarto dedo; dedos posteriores: 4>3>2>=5>1.

Coloración dorsal de fondo cremoso-amarillenta, pardusca o blanquecina. Esta coloración general muestra zonas ensombrecidas en la porción posterior de la cabeza y en la región dorso-lumbar. Sobre esta coloración de fondo se marcan numerosas manchas redondeadas de contornos bien definidos: verdosas, parduscas y ocasionalmente ocráceas, de tamaño y regularidad variable. Las manchas pueden llegar a descomponerse en la región anterior formando un manchado general más o menos denso. Estas manchas dejan una zona clara medio-dorsal en la región escapular, en forma de triángulo o de V invertida, y otra sobre los párpados que llega a formar una banda clara interocular, más o menos continua. En la cara dorsal de las extremidades las manchas son de menor tamaño, pero siguen estando bien definidas. A menudo se marca una ligera hilera de puntos laterales anaranjados que se dispersan por la región posterior del cuerpo y la superficie de las patas.

La coloración ventral es blanco-amarillenta con jaspeaduras parduscas en los bordes de la garganta poco marcadas o ausentes. Cara ventral de las extremidades poco pigmentada, con un ligero espolvoreado oscuro en plantas y palmas. En los ejemplares conservados en fluido se marca llamativamente una densa región de gránulos coloreados de naranja en el borde externo de la región tibiofibular y en la cara ventral del área femoral.

Variación: Los ejemplares observados de Algar de Palancia (Valencia) presentan tonos generales más rojizos (Figura 3 c, d).

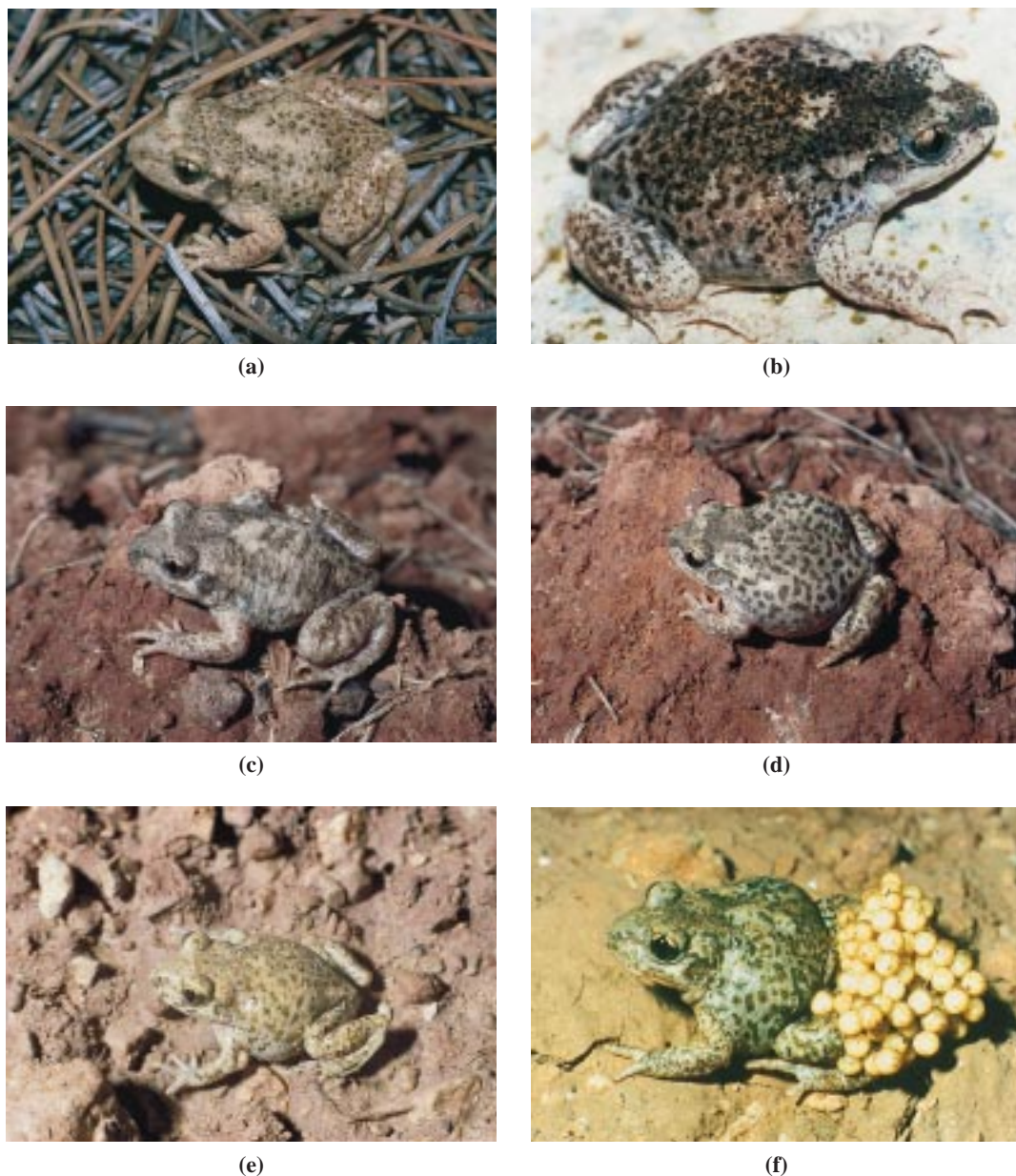


Figura 3.- (a) Holotipo de *Alytes obstetricans pertinax n. ssp.*, macho adulto de Casas Ibáñez, Albacete. (b) Ejemplar adulto de *A. o. pertinax* de Colmenar de Oreja (Madrid). (c) Ejemplar adulto de *A. o. pertinax* de Algar de Palancia (Valencia). (d) Ejemplar adulto de *A. o. pertinax* de Algar de Palancia (Valencia). (e) Ejemplar juvenil de *A. o. pertinax* de Benicassim (Castellón). (f) Ejemplar adulto de *A. o. pertinax* de Benicassim (Castellón).
Figure 3.- (a) Holotype of *Alytes obstetricans pertinax n. ssp.*, adult male from Casas Ibáñez, Albacete. (b) Adult specimen of *A. o. pertinax* from Colmenar de Oreja (Madrid). (c) Adult specimen of *A. o. pertinax* from Algar de Palancia (Valencia). (d) Adult specimen of *A. o. pertinax* from Algar de Palancia (Valencia). (e) Subadult specimen of *A. o. pertinax* from Benicassim (Castellón). (f) Adult specimen of *A. o. pertinax* from Benicassim (Castellón).



Figura 4.- La Tola (Casas Ibáñez, Albacete), localidad típica de *A. o. pertinax*.

Figure 4.- La Tola (Casas Ibáñez, Albacete), type locality of *A. o. pertinax*.

Descripción de las larvas: Las larvas presentan el aspecto típico de los renacuajos de *Alytes*, con una gran plasticidad en talla y forma, que varía según los medios utilizados para la reproducción. Los ejemplares de la mayor parte de las poblaciones estudiadas se caracterizan por presentar un patrón de coloración muy similar al de las larvas de *Alytes dickhilleni*, en el que destaca una banda oscura más o menos fragmentada en la parte superior de la zona muscular de la cola. Esta banda negra puede subdividirse ocasionalmente formando un retículo más o menos denso (Figura 5 a), o puede llegar a desaparecer casi por completo como ocurre en algunas poblaciones de la costa de Castellón (Figura 5 b). El resto de caracteres larvarios es similar a los de *A. o. boscai*.

Etimología. El adjetivo “*pertinax*”, del latín, alude a la capacidad de persistencia de este sapo partero en zonas profundamente humanizadas y sobre todo, afortunadamente, a su resistencia a desaparecer a pesar de las continuas transformaciones que están sufriendo los campos y huertas que constituyen su hábitat más extendido en el centro y este peninsular.

Distribución geográfica: *A. o. pertinax* se distribuye por una amplia región a lo largo de la costa mediterránea española, limitando al norte con el Ebro y zonas próximas de Tarragona y extendiéndose hacia el sur a través de las provincias de Castellón, Valencia y Alicante hasta las sierras de Mariola y Petrer, alcanzando probablemente el norte de Murcia. Hacia el interior se extiende por el sur del Sistema Ibérico y otras sierras de Castilla-La Mancha y Madrid, incluyendo poblaciones en Cuenca, este de Toledo, norte de Albacete, sur de Guadalajara y sureste de Madrid. Se han citado zonas de contacto con *A. o. almogavarii* en el norte de Guadalajara, aunque la asignación taxonómica de estas poblaciones es incierta (GARCÍA-PARÍS, 1995).

Conservación: *Alytes obstetricans pertinax* vive actualmente en zonas abiertas, semiáridas y generalmente deforestadas, muy modificadas por la acción del hombre, donde buscan microhábitats húmedos, como barrancos, encinares umbríos, cultivos de naranjos, alrededores de fuentes, pequeñas corrientes, albercas y abrevaderos. En el Sistema Ibérico meridional todavía mantiene poblaciones fuertes en áreas bien conservadas. Sin embargo, fuera de esa región, la mayoría de las poblaciones encontradas hasta la fecha se reproducen en construcciones humanas para almacenamiento de agua, ya que el acceso a lugares no modificados por el hombre se limita a unos pocos arroyos, ríos y manantiales. Las fuertes sequías, el descenso del nivel freático como consecuencia de la sobreexplotación de acuíferos y el abandono de los antiguos usos de la tierra, que suele conllevar la destrucción de albercas, balsas, abrevaderos y



Figura 5. (a) Larva de *A. o. pertinax* de la Sierra de Mariola (Alicante). (b) Larva de *A. o. pertinax* de Benicassim (Castellón).

Figure 5. (a) Tadpole of *A. o. pertinax* from Sierra de Mariola (Alicante). (b) Tadpole of *A. o. pertinax* from Benicassim (Castellón).

otros depósitos abiertos, han causado recientemente procesos de eliminación de poblaciones a gran escala en la mayor parte de su área de distribución. Este declive es especialmente alarmante en la Comunidad de Madrid y en Castilla-La Mancha, donde las poblaciones de *A. obstetricans* están aisladas, sin que existan corredores naturales entre ellas. En la Comunidad de Madrid se mantienen actualmente cinco poblaciones, todas ellas formadas por un bajo número de efectivos, y localizadas en albercas y pilones en el interior de pueblos o muy próximos a ellos. Se ha constatado su desaparición en todos los demás puntos de reproducción conocidos con anterioridad (GARCÍA-PARÍS *et al.*, 1989; GARCÍA-PARÍS *et al.*, 2000). En la provincia de Toledo sólo se han localizado recientemente dos poblaciones de *A. o. pertinax*, ambas en pilones (La Guardia y Lillo), por lo que, aunque su presencia en otros puntos no es totalmente descartable, la especie debe ser considerada como seriamente amenazada de extinción a corto plazo en esta provincia. Lo mismo ocurre en Albacete, donde muestreos preliminares sólo han permitido detectar nueve áreas de reproducción en toda la provincia, constatándose su desaparición en numerosos puntos donde la presen-

cia de la especie era conocida por los lugareños. En todos los casos el riesgo de desaparición es muy elevado si se producen alteraciones puntuales en los lugares de reproducción. Nuestras observaciones, aunque preliminares, parecen sugerir que también se encuentra en retroceso en la Comunidad Valenciana, ya que muchos de los lugares de reproducción que conocíamos en el oeste y sur de Alicante, y en la costa de Valencia y Castellón, bien han desaparecido (urbanización, abandono) o bien ya no son utilizados por los sapos parteros debido los niveles de contaminación que presentan. Consideramos que las poblaciones de la Comunidad Valenciana, donde la especie aún posee una distribución relativamente amplia (VENTO *et al.*, 1991; LACOMBA & SANCHO, 1999), deben ser sometidas a seguimiento con objeto de determinar el grado de regresión en que se encuentran.

El problema de la localidad típica de *A. o. boscai*: MERTENS & WERMUTH (1960), seguidos por SALVADOR (1974) y GARCÍA-PARÍS (1985), consideraron “Valencia” como la “Terra typica” de *A. o. boscai*. Sin embargo, LATASTE (1879) indicó que el material empleado para la descripción del taxon procedía de “Fuy” (sic) (Pontevedra) y Valencia, señalando

do claramente que sólo el material de la primera localidad (5 ejemplares) fue depositado en los Museos de Bruselas, París y Burdeos, y por tanto sólo esos 5 ejemplares deberían ser considerados como la "Serie tipo" de *A. o. boscai*. La designación de "Valencia" como localidad típica de *A. o. boscai* (MERTENS & WERMUTH, 1960) es errónea. ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS (1995), indicaron que no existe ninguna localidad llamada "Fuy" en la provincia de Pontevedra, pero considerando que el material tipo fue enviado a Lataste por Boscá, y que las únicas zonas que visitó Boscá en Galicia fueron los alrededores de Tuy en la provincia de Pontevedra (BOSCÁ, 1879), podemos concluir sin reservas que la localidad tipo de *A. o. boscai* es: Tuy en la provincia de Pontevedra. Para solucionar definitivamente este problema taxonómico es necesario designar como lectotipo uno de los ejemplares utilizados por Lataste en la descripción original. Tras solicitar los ejemplares de la serie típica a los diferentes museos sólo se obtuvo respuesta del "Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique" en Bruselas. Desafortunadamente la única localidad que muestra el material depositado en este museo es "España". Para confirmar la pertenencia de estos ejemplares a la serie tipo se utilizó una función discriminante (no se muestra). La procedencia gallega de estos ejemplares se confirma, ya que el análisis los sitúa dentro del grupo *A. o. boscai*, que procede de Galicia. Por lo tanto, y para solucionar definitivamente el problema de la "Terra typica", consideramos oportuno designar estos dos ejemplares (antiguo número de registro I. G. 4413 Reg. 167B) del Museo de Bruselas, como lectotipo (número de registro 1924) y paralectotipo (número de registro 1925) de *A. o. boscai*.

DISCUSIÓN

Alytes obstetricans pertinax se diferencia de *A. o. boscai*, además de por los patrones de coloración y diseño (Figura 3), por caracterís-

ticas morfológicas relacionadas con la forma de su cabeza, más larga y con morro relativamente más apuntado. Los resultados del análisis discriminante también permiten diferenciar ambos taxones, ya que la función discriminante obtenida consigue clasificar correctamente un porcentaje superior al 90% de los casos. El análisis preliminar de caracteres osteológicos en esqueletos desarticulados de ambas subespecies es congruente con estos resultados (MARTÍNEZ-SOLANO, sin publicar). Sin embargo la diferenciación morfológica observada no justifica por sí sola la asignación de una identidad taxonómica propia a las poblaciones orientales de *A. obstetricans*. Caracterizar con rigor subespecies de esta especie, es muy difícil desde el punto de vista morfológico, ya que *A. obstetricans* se caracteriza, dentro de *Alytes*, por una morfología "generalista" (SANCHIZ, 1984) variable a escala microgeográfica (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995). En este caso, creemos que el apoyo adicional de los datos genéticos basados en electroforesis de proteínas, que llevaron a GARCÍA-PARÍS (1995) a cuestionar la continuidad de las poblaciones de *A. o. boscai* del oeste y el levante ibérico, y la diferenciación observada a nivel de ADN mitocondrial, ambas de la misma magnitud que la observada entre subespecies actualmente reconocidas, justifican la decisión de otorgar un estatus taxonómico independiente a estas poblaciones.

La asignación de una categoría taxonómica concreta, especie o subespecie, para conjuntos de poblaciones morfológicamente cohesivos, aislados geográficamente y por lo tanto sin evidencia de flujo génico actual entre ellos, y cuando además cada uno de ellos forma aparentemente un grupo monofilético, es un problema de difícil solución. Estos grupos de poblaciones podrían entrar tanto en la categoría de especie como en la de subespecie, con independencia del concepto o definición que se aplique. Parte de esta dificultad puede derivarse de la falta de discusión sobre el concepto de subespecie. Así mientras que el concep-

to biológico de especie, por ejemplo, ha sido, desde su formulación por MAYR (1942), objeto de frecuentes discusiones en el campo de la Biología Evolutiva (ver, por ejemplo, ELDREDGE, 1985; HÄUSER, 1986; TEMPLETON, 1989; KLUGE, 1990), no se ha prestado la misma atención al concepto de subespecie, que carece de criterios generalizados que regulen su identificación y reconocimiento, a pesar de constituir la única categoría taxonómica infraespecífica reconocida en el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ, 2000).

En la mayor parte de las definiciones de subespecie que se manejan a nivel general (ver por ejemplo KING & STANSFIELD, 1990; STRICKBERGER, 1990; ALLABY, 1991) se hace referencia a la necesidad de que exista una discontinuidad geográfica entre las poblaciones analizadas, así como, con importancia variable según los distintos autores, diferencias fenotípicas, genotípicas y/o ecológicas entre ellas. Sin embargo, aparte de recomendarse el apoyo de evidencias procedentes de campos independientes, no existen límites objetivos en estas diferencias que permitan discriminar entre la diferenciación específica y la subespecífica, por lo que la propuesta de subespecies sigue considerándose una labor arbitraria. Sobre la base del citado concepto biológico de especie, generalmente se acepta que las subespecies se diferencian básicamente de las especies en la existencia o no de flujo génico entre ellas (p. ej. AVERS, 1989). Según este criterio, las especies forman grupos poblacionales reproductivamente aislados, mientras que sus subespecies mantendrían cierto grado de flujo génico entre ellas, al menos potencialmente.

La dificultad de aplicar estrictamente el concepto biológico de especie en grupos como los anfibios, en los que el aislamiento reproductor no llega a consumarse entre linajes cuya divergencia se ha estimado en alrededor de 4 millones de años, como por ejemplo entre *Bombina bombina* y *B. variegata* (SZYMURA & BARTON, 1986), o incluso más de 5 millones de años, como entre *Discoglossus pic-*

tus y *D. jeanneae* - *D. galganoi* (BUSACK, 1986; GARCÍA-PARÍS & JOCKUSCH, 1999; MARTÍNEZ-SOLANO, observaciones propias), añade aún mayor dificultad al problema de cómo discriminar entre especies y subespecies. La aproximación más generalizada a este problema suele ser estimar si el grado de divergencia genética o morfológica alcanzado entre los dos grupos alopatricos de poblaciones es suficiente, o no, para proponer su estatus específico, por lo que se mantiene la subjetividad de los autores a la hora de decidir cuando esas divergencias son o no suficientes. Esta decisión suele tomarse por comparación implícita con la divergencia existente entre taxa ampliamente reconocidos dentro del mismo grupo o por designación de un valor supestandamente relacionado con características de aislamiento reproductor (ver por ejemplo HIGHTON, 1995; 1998, pero también WAKE, 1997; WAKE & SCHNEIDER, 1998). En el caso que nos ocupa, la diferenciación genética y morfológica alcanzada por *A. o. pertinax* es del mismo orden que la observada entre *A. o. obstetricans* y *A. o. boscai*, pero mucho menor que la observada entre especies como *A. dickhilleni* frente a *A. muletensis* o *A. obstetricans* (ARNTZEN & GARCÍA-PARÍS, 1995), y por otra parte existen indicios de hibridación entre *A. o. pertinax* y *A. o. almogavarii* en las estribaciones orientales del Sistema Central (GARCÍA-PARÍS, 1995). Por lo tanto consideramos que el rango subespecífico es adecuado para estas poblaciones mediterráneas.

Agradecimientos

Agradecemos a I. Esteban su colaboración desinteresada en la localización de muchas de las poblaciones mencionadas en este trabajo, a C. Martín, E. Pérez-Zapirain, P. Galán, M. Venec, J. I. Lacomba y J. Martínez Valle su ayuda durante los muestreos o el envío de material, a J. E. González por su ayuda en la localización y uso de especímenes de la colección del MNCN, a G. Coulon por su amabilidad en

el préstamo y localización de la serie típica de *A. o. boscai* en el Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique en Bruselas, a M. A. Zarazaga por sugerencias taxonómicas y al equipo de fotografía del MNCN por la realización de las fotos de los ejemplares transparentados y teñidos. Las Agencias de Medio Ambiente de Madrid, Comunidad Valenciana, Galicia y Castilla-La Mancha facilitaron los permisos cuando fueron necesarios para la elaboración de este estudio. La Diputación Provincial de Albacete financió los muestreos en esa provincia. Iñigo Martínez-Solano disfruta de una beca predoctoral Comunidad de Madrid - Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto 07M/0109/2000 de la Comunidad de Madrid.

REFERENCIAS

- ALLABY, M. (1991): *The Concise Oxford Dictionary of Zoology*. Oxford University Press, Nueva York. 508 pp.
- ARNTZEN, J. W. & GARCÍA-PARÍS, M. (1995): Morphological and allozyme studies of midwife toads (genus *Alytes*), including the description of two new taxa from Spain. *Contributions to Zoology*, 65 (1): 5-34.
- ARNTZEN, J. W. & GARCÍA-PARÍS, M. (1997): Phylogeny and biogeography of midwife toads (*Alytes*, Discoglossidae): a rebuttal. *Contributions to Zoology* 66 (4): 263-268.
- AVERS, C. (1989): *Process and Pattern in Evolution*. Oxford University Press, Nueva York. 590 pp.
- BOSCA, E. (1879): Nota herpetológica sobre una excursión hecha en el monte San Julián de Tuy. *An. Soc. esp. Hist. Nat.*, 8: 463-484.
- BOULENGER, G. A. (1897): *The Tailless Batrachians of Europe. Part I*. Ray Society, Londres. III+210 pp.
- BUSACK, S. D. (1986): Biochemical and morphological differentiation in Spanish and Moroccan populations of *Discoglossus* and the description of a new species from Southern Spain (Amphibia, Anura, Discoglossidae). *Annals of the Carnegie Museum*, 55 (3): 41-61.
- COMISION INTERNACIONAL DE NOMENCLATURA ZOOLOGICA (2000): *Código Internacional de Nomenclatura Zoológica*, 4 ed. Museo Nacional de Ciencias Naturales - CSIC, Madrid. 156 pp.
- CLARKE, B. T. (1984): General skeletal morphology, pp. 45-59, in Hemmer, H. & Alcover, J. A. (eds.), *Historia Biológica del Ferreret*. Moll, Mallorca.
- ELDREDGE, N. (1985): *Unfinished Synthesis. Biological Hierarchies and Modern Evolutionary Thought*. Oxford University Press, Nueva York. 237 pp
- GARCÍA-PARÍS, M. (1985): *Los anfibios de España*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 287 pp.
- GARCÍA-PARÍS, M. (1995): Variabilidad genética y distribución geográfica de *Alytes obstetricans almogavarii* en España. *Revista Española de Herpetología*, 9: 133-138.
- GARCÍA-PARÍS, M. & E. L. JOCKUSCH (1999): A mitochondrial DNA perspective on the evolution of Iberian *Discoglossus*. *Journal of Zoology, London*, 248: 209-218.
- GARCÍA-PARÍS, M.; MARTÍN, C.; DORDA, J. & M. ESTEBAN (1989): Atlas provisional de los anfibios y reptiles de Madrid. *Revista Española de Herpetología*, 3(2) (1988): 237-257.
- GARCÍA-PARÍS, M.; MARTÍNEZ-SOLANO, I. & L. GARCÍA ROMÁN (2000): Situación crítica del sapo partero común en la Comunidad de Madrid. *Quercus*, 174: 50-51.
- HÄUSSER, C. L. (1987): The debate about the biological species concept-a review. *Z. zool. Syst. Evolut.forsch*, 25: 241-257.
- KIMURA, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 2: 87-90.
- KING, R. C. & W. D. STANSFIELD. (1990): *A Dictionary of Genetics*. Oxford University Press, Nueva York. 406 pp.

- KLUGE, A. G. (1990): Species as historical individuals. *Biology and Philosophy*, 5: 417-431.
- HIGHTON, R. (1995): Speciation in eastern North American salamanders of the genus *Plethodon*. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 26: 579-600.
- HIGHTON, R. (1998): Is *Ensatina eschscholtzii* a ring species?. *Herpetologica*, 54: 254-278.
- LACOMBA, I. & V. SANCHO (1999): Atlas de anfibios y reptiles de la Comunidad Valenciana. *Boletín de la Asociación Española de Herpetología*, 10: 2-10.
- LATASTE, F. (1879): Sur un nouveau genre de Bâtracien anoure d'Europe. *Compte Rendus hebdomadaire de l'Académie des Sciences, Paris*, 88: 983-985.
- MAYR, E. (1942): *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, Nueva York. 334 pp.
- MERTENS, R. & H. WERMUTH (1960): *Die Amphibien und Reptilien Europas*. W. Kramer, Frankfurt. 264 pp.
- SALVADOR, A. (1974): *Guía de los Anfibios y Reptiles Españoles*. ICONA, Madrid. 282 pp.
- STRICKBERGER, M. W. (1990): *Evolution*. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 579 pp.
- SZYMURA, J. M. & N. H. BARTON (1986): Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toad, *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in Southern Poland. *Evolution*, 40 (6): 1141-1159.
- TEMPLETON, A. R. (1989): The meaning of species and speciation: a genetic perspective, pp: 3-27, in: Otte, D. & Endler, J. A. (eds.), *Speciation and its consequences*. Sinauer, Sunderland.
- VENTO, D.; ROCA, V.; PRADES, R.; QUERALT, T. & J. SÁNCHEZ (1991): Atlas herpetológico de la Comunidad Valenciana. Mitad septentrional. *Revista Española de Herpetología*, 6: 19-28.
- WAKE, D. B. (1997): Incipient species formation in salamanders of the *Ensatina* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7761-7767.
- WAKE, D. B. & C. J. SCHNEIDER (1998): Taxonomy of the plethodontid salamander genus *Ensatina*. *Herpetologica*, 54: 279-298.
- WASSERSUG, R. (1976): A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain & Technology*, 51 (2): 131-134.

Recibido: 21/12/00

Aceptado: 23/03/01