



Vicerrectorado de Internacionalización  
y Postgrado  
Universidad de Oviedo



UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
Vicerrectorado de Internacionalización  
y Postgrado



CENTRO INTERNACIONAL  
DE POSTGRADO  
CAMPUS DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y  
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

**Estructura genética de las  
poblaciones cantábricas de  
*Salamandra salamandra*:  
influencia de la matriz y factores  
topográficos**

Lucía Alarcón Ríos

22 de julio de 2014

## ÍNDICE

<b>1. Resumen/Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>6</b>
3.1. Área de estudio y muestreo	
3.2. Análisis de microsatélites	
3.2.1 Extracción DNA y genotipado	
3.2.2 Análisis de la diversidad genética	
3.2.3 Análisis de la estructura poblacional	
3.2.4 Aislamiento por distancia	
<b>4. Resultados.....</b>	<b>12</b>
4.1. Diversidad genética	
4.2 Estructura poblacional	
4.3 Aislamiento por distancia	
<b>5. Discusión.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>22</b>

## RESUMEN

### Resumen

Tradicionalmente, la biología de la conservación se ha centrado en el desarrollo de medidas al nivel de especie, sin embargo, los avances en la disciplina de la genética de poblaciones han demostrado que un enfoque más realista a la hora de desarrollar medidas eficaces de conservación es la identificación de unidades por debajo del nivel de especie, que es donde realmente reside el potencial evolutivo de una especie. Para ello, conocer cómo se organiza la estructura y diversidad genética de una especie, así como conocer e identificar los factores que determinan dicha distribución y estructuración, constituyen elementos clave a la hora de identificar unidades evolutivas bien diferenciadas. En este trabajo se analizó la estructura y diversidad genética de 25 poblaciones de salamandra común (*Salamandra salamandra*) localizadas en la Cordillera Cantábrica utilizando 9 loci microsatélites. Estas poblaciones presentan una clara estructuración en 3 grandes unidades genéticas, que se corresponden con los áreas de distribución de los tres linajes que confluyen en la zona central del norte de la Península Ibérica: *S.s. bernardezi*, *S.s. fastuosa* y el linaje *alfredchmidti*. Existe además una correlación negativa entre la diversidad genética y la altitud, que junto con el análisis de la presencia de patrones de aislamiento por distancia a diferentes escalas, se utilizan para tratar de determinar la existencia, e identificar, los factores topográficos, ecológicos y ambientales que determinan la distribución y estructura observadas en esta especie.

### Abstract

Historically, conservation biologists have focused their aims on the development of conservation measures using species level as a reference. However, progress in the population genetics discipline has shown that a more realistic approach consists on indentifying units below the species level, where it really lies the evolutionary potential of a species. Therefore, efforts should be focused on knowing the genetic structure of a species, that is, how the genetic diversity is organized, and on the other hand, on knowing and identifying those factors that determine this pattern. Both are key elements to detect and define distinct evolutionary units. In this project we analyze the structure and genetic diversity of 25 populations of the fire salamander (*Salamandra salamandra*) located in the Cantabrian Range, using 9 microsatellite loci. These populations present a clear structure and segregate in 3 major genetic units, which correspond to the ranges of the three lineages that converge in the central part of the northern Iberian Peninsula: *S.s. bernardezi*, *S.s. fastuosa* and the lineage *alfredchmidti*. We found a negative correlation between genetic diversity and altitude, these, coupled to the analysis of the presence of isolation by distance patterns at different scales, are used to determine the existence and identification of the topographic, ecological and environmental factors that determine the distribution and structure observed in this specie.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las actividades humanas están provocando una crisis de biodiversidad sin precedentes que afecta a todos los grupos de seres vivos existentes. Aunque los estudios y planes de conservación generalmente se centran en otros grupos de vertebrados, los anfibios constituyen el grupo más amenazado, incluso más que aves y mamíferos, ya que una tercera parte de las especies se encuentran en peligro de extinción y prácticamente la mitad de las mismas están experimentando una reducción de sus poblaciones. Sin embargo, determinar con exactitud el verdadero estado de conservación de los anfibios es complicado ya que no se dispone de información suficiente de un tercio de las especies descritas (Stuart et al., 2004) pese a que este proceso de reducción de las poblaciones de anfibios no es un fenómeno reciente, sino que viene produciéndose desde hace varias décadas (Houlahan et al., 2000). La totalidad de las causas de este declive dista aún de ser conocida, sin embargo, entre los diversos factores actualmente descritos encontramos la pérdida y fragmentación del hábitat, vulnerabilidad frente a patógenos, la introducción de especies invasoras, el cambio climático, el aumento de la exposición a la radiación UV-B y la contaminación ambiental (Cushman, 2006)

Los anfibios juegan un importante papel en diversos procesos ecológicos, participando por ejemplo en el flujo de materia y energía entre los ecosistemas acuáticos y terrestres, en la regulación de la cadena trófica y en la resiliencia y estabilidad de los ecosistemas (Reinhardt et al., 2013; Mohnke y Rödel, 2009; Davic y Welsh, 2004), además, debido a la sensibilidad de sus poblaciones a múltiples factores bióticos y abióticos, constituyen un sistema ideal para el estudio de los efectos del Cambio Climático, no sólo orientado a la conservación de las poblaciones de anfibios, sino de otras muchas especies, hábitats y ecosistemas (Hopkins, 2007).

Las alteraciones en los ecosistemas y hábitats como consecuencia del Cambio Climático conllevan que las especies que no consigan adaptarse a las nuevas condiciones se extingan. Sin embargo, aunque generalmente los esfuerzos de conservación se llevan a cabo a nivel de especie, los avances que se han dado en el estudio de la genética de poblaciones muestran que un enfoque más realista debería basarse en unidades por debajo de este nivel, como linajes o Unidades Evolutivas Significativas (Moritz, 1994; Crandall et al., 2000), donde reside el verdadero potencial evolutivo de una especie y su capacidad de adaptación a un escenario de cambio climático como en el que nos encontramos. El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones, es decir, cómo se organiza en el espacio la diversidad genética de una especie, así como los procesos que la moldean y que se ven afectados por la misma, constituye uno de los objetivos principales en el ámbito de la conservación a la hora de desarrollar planes de gestión y conservación eficaces (Schwartz et al., 2006) ya que la definición precisa del patrón de organización espacial de la diversidad

genética, así como de los procesos que lo determinan es un punto clave para la identificación de unidades de conservación o unidades evolutivas bien diferenciadas. Estas unidades evolutivas van a verse afectadas no sólo por los eventos de extinción en sentido estricto, sino también por el desplazamiento de las áreas de distribución, que podría llevar a su desaparición, resultando en una disminución de la diversidad genética de la especie, y por tanto, de su potencial adaptativo y evolutivo ante futuros cambios ambientales que pudieran producirse. Sin embargo, esta pérdida de diversidad genética de la especie pasaría desapercibida si el nivel de referencia utilizado es el de especie. Por otro lado, la comprensión de todos aquellos procesos que generan una determinada estructuración de la diversidad genética a escalas espaciales y temporales menores, como es la estructura de poblaciones, puede ayudar en la interpretación de procesos que ocurren a escalas mayores, como análisis filogeográficos.

Todo esto hace que en el ámbito de la conservación sea cada vez más evidente la necesidad de estudios que integren los patrones de distribución de las especies y los de su diversidad genética, así como de la forma en que estos responden a diversos factores ambientales (Cushman, 2006; Velo-Antón et al., 2013), como pueden ser la existencia de barreras a la dispersión, las tasas de flujo génico, los efectos poblacionales de los cambios en el paisaje y las dinámicas fuente-sumidero (Storfer et al. 2010).

Como sistema de estudio para este trabajo se seleccionó el anfibio urodelo *Salamandra salamandra* o salamandra común. Se trata de una especie con un área de distribución muy amplia que se extiende por toda la región Paleártica Occidental y en la Península Ibérica se encuentra presente en Galicia, la cornisa Cantábrica y todos los Pirineos aunque también puede encontrarse en las sierras del Sistema Central, los Montes de Toledo, Sierra Morena y las sierras Béticas. Con una gran diversidad ecológica, podemos encontrarla hasta los 2.500 metros de altitud, y en algunas poblaciones como las cantábricas combinan ovoviviparismo y viviparismo (Dopazo y Alberch, 1994; Buckley y Alcobendas, 2002). A lo largo de su área de distribución esta especie presenta un alto grado de diversidad genética y una estructuración espacial de la misma compleja y altamente jerarquizada (con diversos linajes, clados y/o poblaciones genéticas) (Steinfartz et al., 2004). Los linajes que confluyen en el noroeste de la Península Ibérica han recibido el reconocimiento como subespecies distintas, aunque estudios de sistemática molecular han demostrado que no se tratan de entidades monofiléticas, y en el norte peninsular se han agrupado en dos grupos monofiléticos: el complejo *fastuosa-bernardezi* y *gallaica-terrestris* (Alcobendas et al., 1994; Alcobendas et al., 1996; Buckley y Alcobendas, 2002). Por ello, si consideramos la especie como tal, el área de distribución es muy amplia, pero si consideramos el nivel de linaje o subespecie nos encontramos con una situación de áreas locales muy restringidas, lo que resulta en una mayor vulnerabilidad y mayor riesgo de extinción. Este trabajo se realizará sobre poblaciones de las subespecies *S. s. fastuosa* (Schreiber, 1912) y *S.s. bernardezi* (Wolterstorff, 1928) (complejo *fastuosa-bernardezi* (Alcobendas et al., 1996) que incluye además la zona de ocurrencia de *S.s. alfredschmidtii* (Köhler y Steinfartz, 2006), en cuya área de distribución se ha observado tanto la ocurrencia de viviparismo como la reproducción con fase larvaria acuática.

*S. salamandra* es una especie para la cual la mayor parte de estudios de ecología molecular que se han realizado se han hecho sobre las pautas de subdivisión a escalas espaciales amplias, a nivel filogeográfico (por ejemplo Alcobendas et al., 1994; Veith et al., 1998; Steinfartz et al., 2000; García-París et al., 2003) y no a nivel de estructura genética a escala fina. A la hora de analizar la estructura de la diversidad genética de una especie, es necesario relacionarlo con otros rasgos de su ecología y biología, aspectos fundamentales que determinan la estructura, y que permiten evaluar el estado de conservación de una especie y los riesgos a los que puede verse sometida.

*S. salamandra* presenta una gran diversidad ecológica, así como variedad en los modos de reproducción, que permiten una menor dependencia de las masas de agua para completar el ciclo vital, lo puede llevar a pensar en una ausencia de estructura genética (hipótesis 1). Sin embargo, si tenemos en cuenta que los anfibios urodelos presentan, por lo general, un comportamiento filopátrico y bajos niveles de dispersión (Rebelo y Leclair, 2003), y que a lo largo del área de estudio encontramos tres subespecies descritas, podríamos esperar encontrar una estructura genética bien definida (hipótesis 2). Por otro lado, estudios con otras especies de anfibios (por ejemplo Giordano et al., 2007) muestran la existencia de una correlación negativa entre la diversidad genética y la altitud debido sobre todo a los mayores niveles de aislamiento a los que se ven sometidas las poblaciones en zonas más altas, que reducen las tasas de flujo génico y la conectividad entre ellas. Siguiendo este patrón podemos esperar que las poblaciones estudiadas de *S. salamandra* situadas en zonas más bajas presenten unos niveles de diversidad genética mayores que aquellas poblaciones presentes en zonas más altas (hipótesis 3).

Por ello, con el fin de dar respuesta a las cuestiones presentadas, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos: i) determinar la estructura genética a una escala espacial fina, y la distribución de la diversidad genética de las poblaciones de *Salamandra salamandra* complejo *fastuosa-bernardezi* en la Cordillera Cantábrica utilizando marcadores moleculares neutros y ii) identificar los aspectos topográficos, ecológicos y ambientales que pueden haber afectado a la conectividad de las poblaciones, y por tanto, a su estructuración.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Área de estudio y muestreo

En la franja norte de la Península Ibérica existen cinco variantes de *S. salamandra*: *S. s. bernardezi*, *S.s. alfredschmidtii* (existe desacuerdo sobre su categoría como subespecie), *S. s. fastuosa* y *S.s. terrestris* y *S.s. gallaica*. Siguiendo esta sistemática, el área de distribución de *S. s. bernardezi* se extiende por la parte oeste de la Cordillera Cantábrica, desde la zona norte oriental de Galicia hasta la zona más occidental de Cantabria, englobando toda la provincia de Asturias (Thiesmeier y Grosenbacher, 2004), mientras que la subespecie *S. s. fastuosa* se extiende desde la zona central de Cantabria hasta la zona sur de los Pirineos occidentales (García-París et al., 2003). La distribución de *S.s.alfredschmidtii* conocida hasta el momento es mucho más restringida, habiendo sido detectada en los valles de Tendi, Color, Marea, Llerandi, Fuensanta y Sierra del Sueve. Sin embargo, como se ha explicado previamente, diversos estudios moleculares han agrupado estas subespecies en dos grandes grupos taxonómicos: el complejo *gallaica-terrestris* y el complejo *fastuosa-bernardezi* (Alcobendas et al., 1994, 1996), al cual pertenecen las poblaciones muestreadas para este trabajo. Todas las poblaciones excepto una (Valdediezma, en el extremo occidental de Cantabria) se encuentran dentro de los límites de Asturias. Una parte de las mismas se localizan en la zona este de Asturias, dentro del Parque Nacional de los Picos de Europa y las demás poblaciones se localizan más hacia el oeste y en zonas costeras (**Figura 1**). La Cordillera Cantábrica constituye un área de estudio muy heterogéneo, con hábitats muy diversos en cuanto a temperatura, humedad, disponibilidad de lugares para la reproducción, orientación, frecuencia de nevadas, grado de antropización etc., factores que pueden constituir barreras a la dispersión afectando a la conectividad entre poblaciones, y por tanto favoreciendo la diferenciación entre poblaciones locales, bien por aislamiento o por la aparición de adaptaciones locales.

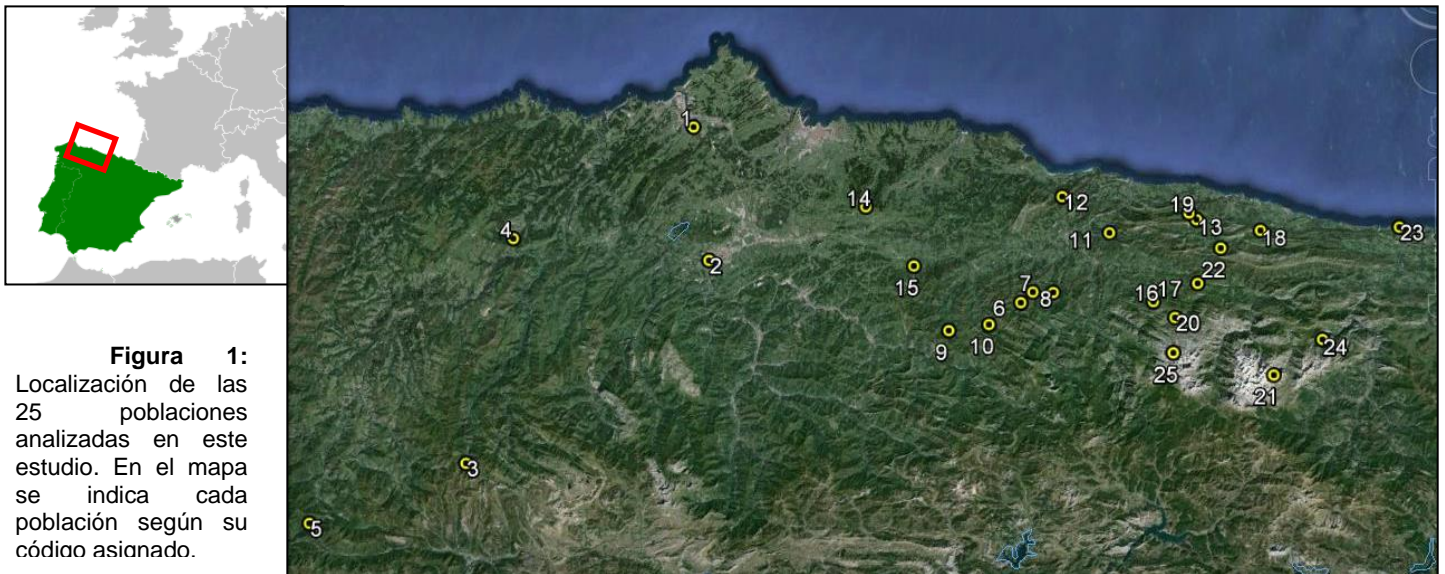
Se analizaron muestras de 224 individuos procedentes de 25 poblaciones y recogidas entre 2007 y 2010. Estas poblaciones se encuentran distribuidas en un amplio rango altitudinal (desde 60 hasta los 1850 m.s.n.m.) (**Tabla 1**), lo que implica una gran heterogeneidad de ambientes de procedencia. Los muestreos se realizaron mediante transectos, fundamentalmente durante la noche y en cada localidad se recogieron todos los individuos detectados hasta un máximo de 50-75, aunque en algunos puntos el número de animales capturados y analizados fue mayor. En general, los ejemplares capturados fueron trasladados al laboratorio, en donde se registró si eran adultos o juveniles, el sexo, la masa ( $\pm 0,01$  g), y si se ajustaban a alguna de las variantes de coloración descritas para *S.s.alfredschmidtii*. Además, todos los ejemplares fueron fotografiados en vista dorsal y cuidando de mantener el paralelaje entre el plano del sensor y el plano de imagen. Para obtener material genético, de

cada ejemplar se colectó una muestra de mucosa bucal o bien una muestra de tejido de uno de los dedos de las patas posteriores.

### **Análisis de microsatélites**

#### ***Extracción de DNA y genotipado***

Para la obtención de DNA se utilizaron dos tipos de muestras: mucosa bucal y tejido procedente de la parte apical de un dedo (Gonser et al., 1996). Para la extracción del DNA nuclear se utilizó el kit de extracción de DNA E.Z.N.A. Tissue DNA kit de OMEGA Bio-Tek. En el análisis de la estructura genética se utilizaron 9 microsatélites específicos de *Salamandra salamandra* (Steinfartz et al., 2004). (**Tabla 2**).



**Figura 1:** Localización de las 25 poblaciones analizadas en este estudio. En el mapa se indica cada población según su código asignado.

#### ***Análisis de la diversidad genética***

Se llevó a cabo el análisis de los estadísticos básicos para cada locus en el global de los individuos muestreados, determinando el número de alelos por locus, el número de individuos en los que aparece, la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y el equilibrio de Hardy-Weimberg (HW) para cada uno, utilizando los programas CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007) y GENEPOP v 4.2. (Raymond y Rousset, 1995). Estos estadísticos también se calcularon para cada una de las poblaciones geográficas muestreadas, salvo para la población de Moñetas (21) al haberse capturado un único individuo, de las cuales se determinó la  $H_e$ ,  $H_o$ , número medio de alelos por locus (riqueza alélica) y el coeficiente de endogamia (Fis) (Weir and Cockerham, 1984), para calcularlo se utilizaron FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 1995, 2001), sin asumir equilibrio de HW, y GENETIX v. 4.05 (Belkhir et al., 2004). El equilibrio de HW de cada población se testó utilizando el software GENEPOP v 4.2. (Raymond y Rousset, 1995), al no tener una idea previa de hacia qué dirección podía existir un desplazamiento del equilibrio de HW, se analizaron las dos hipótesis alternativas posibles, exceso y déficit de heterocigotos. La significación de los resultados se calculó utilizando el método de la cadena Markov (Guo y Thompson, 1992) con 5000 pasos de aleatorización y 1000 tandas de 10000 interacciones cada



una. La riqueza alélica se ve especialmente afectada por el tamaño de muestra, lo que dificulta la comparación de resultados entre muestras de diferente tamaño (Leberg 2002), como es nuestro caso. Por ello, se utilizó el programa ADZE v 1.0. (Szpiech et al., 2008), que aplica una corrección de los valores de riqueza alélica mediante rarefacción, una estandarización del número medio de alelos por locus respecto al menor tamaño de muestra (Leberg 2002).

Para analizar si existe correlación entre la altitud y la diversidad genética se llevó a cabo una correlación de Pearson empleando el paquete estadístico SPSS v. 18, entre la variable Altitud y las medidas de diversidad genética  $H_e$ ,  $H_o$ , riqueza alélica y riqueza alélica corregida.

### ***Análisis de la estructura poblacional***

Se utilizó el programa STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) para inferir el número de unidades genéticas diferenciadas (*clusters*) en los que podían agruparse las 25 poblaciones estudiadas. Este software asume que hay un número real de  $K$  clusters, cada uno de los cuales se caracteriza por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus, y asigna a los individuos analizados una probabilidad de pertenecer a cada cluster utilizando el genotipo de cada uno de ellos en esos loci (microsatélites en nuestro caso) mediante una aproximación Bayesiana, sin conocimiento previo de posibles afinidades entre poblaciones. El modelo utilizado busca equilibrio de HWE y desequilibrio de ligamiento y trata de crear agrupamientos de poblaciones que, en la medida de lo posible, no se encuentren en desequilibrio (Pritchard et al., 2000). STRUCTURE nos proporciona el logaritmo de la probabilidad de los datos ( $\ln \Pr(X|K)$ ) para cada uno de los valores de  $K$ , permitiendo el cálculo del número de clusters más probable.

En STRUCTURE se utilizó el *Admixture model* que asume una potencial mezcla ancestral entre los individuos, los diferentes locus se consideraron no ligados, y las frecuencias alélicas correlacionadas. Se hizo un estudio preliminar, ejecutando el programa con un valores de K entre 1, que sería el valor esperado si existiera una conectividad total entre todas las poblaciones, hasta 15, un número de clusters que se consideró suficientemente alto (se podría haber utilizado K=25 como número máximo de grupos, pero en observaciones previas se vio que con 15 era suficiente), para estimar los valores de  $\ln \Pr(X|K)$  tras un periodo de burn-in de 20.000 iteraciones seguido de un periodo de estimación de parámetros de 20.000 MCMC iteraciones. Tras estos análisis preliminares, se confirmó que un valor máximo de K=15 era suficiente, ya que el  $\ln \Pr(X|K)$  aumentaba rápidamente hasta valores de K de 6 u 8, a partir de los cuales se estabiliza. A continuación, se pasó a ejecutar el programa de forma definitiva con valores de K entre 1 y 12, con 100.000 burn-in y 150.000 iteraciones MCMC, repitiendo cada una 20 veces y utilizando los mismos parámetros que en el ensayo preliminar.

En STRUCTURE, el número real de poblaciones (K) se identifica a partir del valor máximo de  $\ln \Pr(X|K)$  que proporcionaba el programa, sin embargo, Pritchard et al., 2000, advierten del carácter orientativo de este valor y exponen la dificultad de estimar el verdadero valor de K y las dificultades a la hora de darle una interpretación biológica a los resultados de STRUCTURE, especialmente en casos en los que, como el nuestro,  $\ln \Pr(X|K)$  aumenta conforme aumenta K, lo que puede llevar a sobreestimar el número de *clusters* genéticos. Por ello, para la determinación del valor de K se utilizó la comparación del valor de  $\ln \Pr(X|K)$  y la aproximación propuesta por Evanno et al. (2005), un método que busca un máximo no ambiguo en la distribución de  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005). Estos autores vieron que una vez que se alcanzaba el valor de K real, el valor de  $\ln \Pr(X|K)$  o bien se estabilizaba, o bien seguía aumentando ligeramente, al mismo tiempo que aumentaba la varianza entre simulaciones, por lo que estos autores desarrollaron la medida  $\Delta K$  para ayudar a determinar el número de clusters genéticos real. Aplicando el método de Evanno et al., 2005 a estos resultados, calculando  $\Delta K$ , podemos destacar el punto (valor de K) en el que se rompe la tendencia de la curva de distribución de los valores de  $\ln \Pr(X|K)$ , constituyendo este el verdadero valor de K. Una vez identificado el número 'real' de unidades genéticas a partir de los resultados de STRUCTURE, las poblaciones geográficas se asignaron a un determinado cluster si su probabilidad de pertenencia media al mismo era igual o superior al 70% (Zamudio y Wiczorek, 2007).

### ***Aislamiento por distancia***

Tanto para el cálculo de las distancias genéticas entre pares de poblaciones locales ( $F_{st}$ ), como en los tests de Mantel para contrastar la hipótesis de aislamiento por distancia (IBD) se excluyó la población de Moñetas (21), porque sólo contenía un individuo muestreado.

Para determinar el grado de diferenciación genética entre poblaciones se calculó el  $F_{st}$  (Weir y Cockerham, 1984) por pares de poblaciones utilizando el programa FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 1995, 2001), y la significación se determinó mediante la aplicación de la corrección secuencial de Bonferroni (Rice 1989).

Se analizó la correlación existente entre la distancia genética entre poblaciones ( $F_{st}$ ) y la distancia geográfica entre las mismas, que se calculó utilizando la aplicación web Iberpix del Instituto Geográfico Nacional (Ministerio de Fomento), en busca de patrones de aislamiento por distancia (IBD). Para ello se llevaron a cabo varios test de Mantel a diferentes niveles utilizando la interfaz web de IBD (IBSWS) (Jensen et al., 2005), con 10.000 aleatorizaciones en cada análisis. Dado que los patrones de aislamiento por distancia puede darse sólo a determinadas escalas dependiendo de otros factores que pueden estar implicados en un proceso generador de estructura espacial en la diversidad genética de una especie (p.e., existencia de barreras que reducen significativamente el flujo génico), la hipótesis de aislamiento por distancia se contrastó a diferentes escalas y para diferentes zonas delimitadas dentro del área de estudio, que se agrupan en 4 niveles: el Nivel 1) que agrupa i) total, el área ocupada por todas las poblaciones analizadas; Nivel 2), que incluye i) las poblaciones de la zona occidental y central (comprendidas todas ellas entre el río Navia y el extremo oeste de la Sierra de Cuera) y ii) las poblaciones de la zona central y la zona oriental (incluyendo las poblaciones comprendidas entre el valle de Marea hasta las localizadas en torno al río Cares); el Nivel 3, con i), ii) y iii), englobando el área de cada uno de los clusters principales (occidental, central y oriental, respectivamente), incluyendo, cuando la delimitación de la zona lo requería, las poblaciones cercanas; por último, el Nivel 4, con i) las poblaciones comprendidas entre los ríos Sella y Cares, dos posibles barreras geográficas a la dispersión, a continuación, para determinar la existencia de otras posibles barreras a la dispersión se buscaron patrones de aislamiento por distancia a ambos lados del río Sella, un gran río que se localiza aproximadamente en el punto de segregación de los clusters central y oriental, ii) las poblaciones al oeste del Sella y iii) las poblaciones al este del Sella. Y por último, dentro del Nivel 4, iv) se testó a la escala que incluye todas las poblaciones al este del río Nalón, otra potencial barrera geográfica.

## RESULTADOS

### Diversidad genética

Cuando testamos el equilibrio de HW, al utilizar como hipótesis alternativa un exceso de heterocigotos las 24 poblaciones se encontraron en equilibrio (datos no mostrados). Sin embargo, cuando la hipótesis alternativa era un defecto de heterocigotos, en 13 de las 24 poblaciones se observó una desviación respecto al equilibrio de HW, lo que denota que en estas poblaciones aparece un menor número de heterocigotos de los que se cabría esperar si estuvieran en equilibrio (**Tabla 1**). Este hecho se corrobora con los valores del coeficiente de endogamia,  $F_{is}$ , el cual varía desde -0,12 en la población de La Viliella (5) hasta 0,364 en la población La Huesera (16). Para las 24 poblaciones para las que se calculó el  $F_{is}$ , y tras aplicar el ajuste de Bonferroni, sólo 5 presentan valores positivos significativos del mismo: Suevo (12), Fuensanta (15), Mañangas (18), Pimiango (23) y Valdediezma (24), indicando que en esas poblaciones existe un defecto de heterocigotos por endogamia (**Tabla 1**).

Las **Tablas 1 y 2** recogen también los estadísticos genéticos básicos para cada población y para cada locus, respectivamente. El número de alelos por locus va desde 9 alelos para el locus *Sa/23* hasta 44 alelos para el locus *Sa/3*. Dentro de las poblaciones, el número medio de alelos por locus varía desde 2,67 hasta 9,22. Al considerar la riqueza alélica corregida respecto al tamaño de muestra por rarefacción respecto a la población con menor número de individuos genotipados ( $N=2$ ), el rango de riqueza alélica oscila entre 1,57 para la población de Fario (14) y 1,85 para la población de Suevo (12).

La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) varía en un amplio rango, desde 0,48 hasta 0,81. Sin embargo las 7 poblaciones con la heterocigosidad esperada más baja (0,48-0,64) presentan un tamaño de muestra muy pequeño (un único individuo las tres con menor  $H_e$  y 3 o 4 individuos las seis siguientes), lo que podría explicar esos valores de  $H_e$  tan bajos. Por lo tanto, si no consideramos estas nueve poblaciones, el rango de heterocigosidad se reduce (0,69-0,81). La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) sin embargo, presenta un rango menor (0,45-0,78) considerando todas las poblaciones, y las que menor heterocigosidad presentan no coinciden con las que tienen un menor tamaño muestral como es el caso de la  $H_e$ .

El test de correlación de Pearson muestra la existencia de una correlación negativa significativa entre la altitud y la  $H_e$  y riqueza alélica ( $r=-0,587$ ,  $p=0,002$ ;  $r=-0,517$ ,  $p=0,008$  respectivamente), mientras que la  $H_o$  y la riqueza alélica corregida no muestran valores significativos ( $r=-0,076$ ,  $p=0,720$ ;  $r=-0,260$ ,  $p=0,219$ ).

### **Estructura poblacional**

Los resultados obtenidos con STRUCTURE muestran que el valor de  $\ln \Pr(X|K)$  aumenta hasta un valor de  $K=8$ , a partir del cual se estabiliza (**Figura 2a**). En nuestro caso, el máximo valor de  $\Delta K$  vemos que se alcanza en  $K=3$  (**Figura 2b**), es decir, se diferencian 3 unidades genéticas en los que se pueden agrupar las poblaciones originales (**Figura 3b**). Las poblaciones asignadas a cada cluster puede verse en la **Figura 4**. Esta asignación de las poblaciones originales a cada *cluster* se realizó utilizando como criterio que la asignación media de cada población (en las 20 repeticiones) a uno u otro cluster fuera igual o mayor al 70%.

Una vez clasificadas las poblaciones se pasó a estudiar cómo se distribuía esta diversidad genética en el espacio (**Figura 4**) y se vio que la diversidad genética entre las poblaciones se repartía en tres grandes zonas: poblaciones de la zona occidental (W), de la zona central (C) y de la zona oriental (O) del área de estudio. Sin embargo, encontramos algunas poblaciones que no se asignan de forma mayoritaria a una unidad genética en particular, constituyendo poblaciones mezcladas de los tres grandes grupos genéticos identificados.

Las medidas de diversidad genética para los diferentes clusters se evaluó calculando la media de los diferentes valores de diversidad genética ( $H_e$ ,  $H_o$ , riqueza alélica y riqueza alélica corregida) de todas las poblaciones asignadas a cada cluster (**Tabla 3**). La unidad genética Central es la que mayor diversidad genética presenta en cuanto a  $H_e$  y riqueza alélica (tanto normal como corregida respecto al tamaño de muestra).

### **Aislamiento por distancia**

La distancia genética por pares de poblaciones medida mediante los valores de  $F_{st}$  abarca un rango desde la menor distancia 0 entre las poblaciones de Sueve (12) y Vegarredonda (25) valor que no resulta significativo, hasta la mayor de 0,2589 entre las poblaciones de Oviedo (2) y Fario (14). Tras un ajuste de Bonferroni secuencial para evaluar la significación de los valores de  $F_{st}$  obtenidos, resultaron significativos 188 de las 276 comparaciones por parejas realizadas (**Tabla 4**).

Al analizar la correlación entre la distancia genética y geográfica entre las 24 poblaciones estudiadas (menos Moñetas), encontramos que los test de Mantel presentan, aunque baja, una correlación significativa positiva ( $r=0,2929$ ,  $p\text{-valor}=0,0374$ ) (TABLA 6). De la misma manera, cuando reducimos la escala, vemos que existe una correlación significativa cuando consideramos juntas las poblaciones occidentales y centrales, así como las centrales y orientales. Sin embargo, cuando se analiza el patrón de aislamiento por distancia a nivel de las poblaciones orientales y occidentales por separado, no existe una correlación significativa. Por el contrario, a la escala de la población central, ésta presenta la mayor correlación positiva significativa de todos los análisis realizados ( $r=0,4832$ ,  $p\text{-valor}=0,0288$ ). Los test de Mantel realizados con las poblaciones situadas a uno y otro margen del río Sella no aportaron una correlación significativa, así como tampoco aparece dicha correlación en el grupo de poblaciones que se localizan entre el río Cares y el río Sella. El test llevado a cabo con todas las poblaciones al este del Nalón, indica la presencia de un patrón de aislamiento por distancia al este de dicho río. (**Tabla 5**)

## DISCUSIÓN

Las poblaciones cantábricas de *Salamandra salamandra* analizadas en este estudio presentan una estructuración de su diversidad genética a la escala considerada, diferenciándose claramente tres grandes unidades genéticas o *clusters*, que presentan una correspondencia geográfica, pudiendo distinguir una unidad genética Occidental (W), una Central (C) y una Oriental (O). Aparece también un conjunto de poblaciones mezcla de los tres grandes grupos definidos que aunque no constituye una unidad genética diferenciada, sino una serie de poblaciones con una estructura genética intermedia entre las unidades bien definidas, en adelante en esta discusión la denominaremos grupo Mixto (M). Si tenemos en cuenta que en la zona central del norte peninsular, correspondiente a nuestro área de estudio, confluyen los tres linajes o subespecies anteriormente descritos y la distribución hasta ahora conocida de los mismos, se puede pensar en una correspondencia entre dichos linajes con los grandes grupos genéticos delimitados. Es decir, si consideramos que las poblaciones agrupadas en el cluster occidental pertenecen a la subespecie *S. s. bernardezi* (localidad tipo: Oviedo), la diferenciación que presentan respecto al grupo genético del extremo oriental del área de muestreo, y la coincidencia de esta zona con el límite de distribución de la subespecie *S.s. fastuosa* (clásicamente definida desde la zona occidental de Cantabria hasta la vertiente suroccidental de los Pirineos), se podría concluir que esta diferenciación refleja la zona de contacto entre ambas, pudiendo tratarse de poblaciones puras de la subespecie *fastuosa* o bien, de una zona híbrida entre ambas, ya que en otros estudios se observó que la zona de contacto de ambas subespecies es bastante difusa, con unos límites poco claros (García-París et al., 2003). Aunque a nivel molecular, Alcobendas et al. (1994, 1996) propusieron, mediante un análisis de aloenzimas, la existencia de una baja diferenciación genética entre estas dos subespecies, ambas vivíparas, pudiendo agruparlas en el complejo *fastuosa-bernardezi*, los análisis de DNA mitocondrial (mtDNA) llevados a cabo por Dopazo et al. (1998), muestran una clara diferenciación dentro del complejo *fastuosa-bernardezi*.

Por otro lado, las poblaciones que se incluyen en el cluster central coinciden con el área de distribución descrita del linaje *alfredchmidti*. Además, en seis de las ocho poblaciones incluidas en este grupo (excepto en Zardón (11) y Jolagua (17)), se ha encontrado el patrón de coloración característico de *alfredchmidti*. Las dos poblaciones asignadas al cluster central y en las que no se ha detectado el fenotipo *alfredchmidti* se encuentran situadas al este del río Sella, que podría constituir una importante barrera geográfica, sin embargo, las poblaciones incluidas en este *cluster* presentan un patrón significativo de aislamiento por distancia, que no existiría si el río Sella constituyera una verdadera barrera a la dispersión (Pope et al., 2006). Por el contrario, Fuensanta (15), se trata de una población que no se asigna al cluster

central con más de un 70% de probabilidad, pero en la que aparece el fenotipo *alfredschmidtii*, sin embargo, su porcentaje de asignación a la agrupación central es de casi el 50% y más de un 30% a la unidad genética occidental, pudiendo constituir una zona híbrida de ambos linajes.

Esta estructura se refuerza si nos fijamos en la agrupación de poblaciones con un  $K=2$  (**Figura 3a**). Vemos que cuando asumimos este número de poblaciones existe una estructuración genética clara de las poblaciones geográficas, por un lado las poblaciones Occidentales y Orientales se engloban dentro de la misma unidad genética, y por otro, las poblaciones Centrales constituyen otra unidad diferenciada de la primera. Además continúa apareciendo un grupo de poblaciones con una estructura intermedia a ambas unidades genéticas. De la misma manera, cuando aumentamos el valor de  $K$  hasta  $K=4$  (**Figura 3c**) vemos que el grupo occidental se divide en dos, sugiriendo la existencia de una estructura genética a menor escala dentro de este cluster, mientras que el grupo Central y Oriental se mantienen diferenciados, además de las diversas poblaciones con una asignación considerable a varios clusters genéticos. La existencia de una estructura de la diversidad genética definida incluso con altos valores de  $K$  (**Figura 3d-g**), es indicativo de que en un estudio a una escala más pequeña, sería posible encontrar un alto grado de estructuración genética de las poblaciones de *S. salamandra*. Destaca el caso de la unidad genética formada por las poblaciones de Color (6), Tendi (7) y Llerandi (8), tres poblaciones en las que aparece el linaje *alfredschmidtii*, que ya aparece con un  $K=2$  y se mantiene diferenciada del resto incluso hasta valores de  $K=8$ .

La existencia de zonas mixtas o zonas de mezcla, es decir, poblaciones o grupos de poblaciones donde se observa la confluencia de diferentes grupos genéticos, es otro aspecto importante de la estructura genética de *S. salamandra* en la Cordillera Cantábrica. En nuestro caso podemos distinguir un núcleo de poblaciones mixtas, que no se asigna a ninguno de los tres clusters de forma mayoritaria, y que se localizan, genética y geográficamente, entre los grandes grupos central y oriental. La hibridación entre taxones divergentes (ya sean, en nuestro caso, *bernardezi-fastuosa* o *bernardezi-fastuosa-alfredschmidtii*) a lo largo de sus límites de distribución es relativamente frecuente, lo que favorece la introgresión de variación genética, que suele resultar en un aumento de la variabilidad dentro de las poblaciones, con una menor diversidad dentro y entre los grupos considerados (Wake 1997). La existencia de poblaciones mixtas es indicativo de que aunque existe cierta estructuración, no se trata de una estructura genética muy extrema, lo que hace pensar que la fenología de reproducción no constituye una barrera para el flujo génico entre las diferentes poblaciones muestreadas.

Sin embargo, a la hora de interpretar estos resultados, es conveniente tener en cuenta en todo momento, que la efectividad de la asignación a una u otra población depende de una serie de factores, incluyendo el número de individuos, el número de loci analizados, el grado de mezcla entre las poblaciones, y la amplitud de las diferencias en frecuencias alélicas entre las poblaciones (Pritchard et al., 2000), por lo que si se aumentara el número de individuos muestreado en algunas poblaciones o los loci analizados, ciertas poblaciones podrían resultar asignadas de forma diferente a la que aquí observamos.



Los test de Mantel llevados a cabo evidencian la existencia de un patrón de aislamiento por distancia en todo el área de estudio, así como a una menor escala, en su mitad oriental y occidental. En cuanto a la diversidad genética que encontramos en las tres grandes unidades genéticas en las que se dividen las poblaciones cantábricas estudiadas vemos que las poblaciones del cluster Central son las que presentan una mayor diversidad genética media ( $H_e$ , riqueza alélica y riqueza alélica corregida), que se corresponde geográficamente con el área de distribución de *S. s. alfredchmidti*. A este grupo le sigue el cluster Occidental, y la menor diversidad genética la presenta el cluster Oriental.

La existencia de diferencias en la diversidad genética de las poblaciones de *S. salamandra* puede deberse a varias causas. Por un lado, en este trabajo se encontró que se produce una disminución de la diversidad genética a medida que aumenta la altitud, patrón que coincide con los resultados obtenidos por Giordano et al. (2007) para la especie *Ambystoma macrodactylum*. Los anfibios son un grupo particularmente sensible a los efectos de la altitud y la topografía (Spear et al., 2005; Giordano et al., 2007; Álvarez et al., 2011), ya que los anfibios en general (Palo et al., 2004), y los urodelos en particular (Smith y Green, 2005) presentan unas tasas de dispersión bajas. *S. salamandra* no es una excepción, presentando además una marcada tendencia filopátrica, especialmente a partir del inicio de la etapa adulta reproductora (Rebelo y Leclair, 2003). Esta baja vagilidad hace que diversos atributos geográficos, como las clinas altitudinales, u otras características del paisaje, como la proporción de hábitat favorable, el carácter de la matriz o los tipos de uso del suelo (Ray et al., 2002) determinen el grado de aislamiento de una población. Giordano et al. (2007) observaron que los niveles de flujo génico entre las poblaciones de *A. macrodactylum* situadas a mayor altitud eran menores que los de las poblaciones localizadas en zonas más bajas, y como consecuencia de este aislamiento, la diversidad genética dentro de las poblaciones de altitud era menor. Al mismo tiempo que disminuye la diversidad genética se produce un aumento de la diferenciación poblacional ya que las diferentes condiciones locales que se dan a lo largo de un gradiente altitudinal ejercen una presión selectiva en las poblaciones, llevando a una diferenciación local de las mismas. Si en estas poblaciones el flujo génico está restringido, como es el caso de las poblaciones de altitud, el grado de diferenciación entre ellas será mayor. En el caso del cluster Oriental tres de sus poblaciones se encuentran en los Picos de Europa, una región montañosa con grandes desniveles, además de la presencia en su área de distribución de grandes ríos como el Cares y el Sella, es decir, características del terreno que pueden constituir barreras geográficas importantes. Aunque no hay datos suficientes para identificar dichas barreras a la dispersión, la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia en estas poblaciones sugiere la existencia de las mismas.

Por su parte, el área de las poblaciones del cluster Occidental se encuentra atravesado por dos ríos muy caudalosos, el Nalón y el Narcea, que se podrían considerar potenciales barreras a al flujo génico. En este caso el patrón de aislamiento por distancia que se detecta es apenas significativo, artefacto quizás causado por el número de poblaciones testadas, pero que si tomamos como válido indica la ausencia de importantes barreras a la dispersión. Por último, las poblaciones pertenecientes al grupo central se distribuyen por una zona en la que apenas existen barreras

geográficas importantes, aspecto que puede favorecer la conectividad entre poblaciones y por tanto explicar los niveles de diversidad genética que presenta, así como al marcado patrón de aislamiento por distancia encontrado.

Otra de las causas que puede originar una disminución en la diversidad genética de las poblaciones es la reciente colonización por parte de la especie de nuevas regiones a partir de refugios en periodos glaciares (Pope et al., 2006). Los cambios climáticos que se produjeron en el Pleistoceno, provocaron la existencia de glaciares por encima de los 750 metros de altitud en la región donde se localizan las poblaciones vivíparas de *S. salamandra*, sin embargo las características del terreno pudieron permitir la supervivencia de pequeñas poblaciones aisladas en las zonas costeras, o en valles profundos (García-París et al., 2003), a partir de las cuales se produjo una expansión del área de distribución. Por lo tanto, la baja diversidad genética que encontramos en las poblaciones altas podría deberse a una reciente colonización de estas regiones.

Por otro lado, el hecho de que la  $H_0$  no se encuentre correlacionada de forma significativa con la altitud puede deberse a que 13 de las 24 poblaciones presentan una desviación respecto al equilibrio de HW, con un defecto de heterocigotos, es decir, unos niveles de homocigosis mayores de los esperados en una población en equilibrio, lo que puede distorsionar la correlación con la altitud. En el caso de la riqueza alélica corregida, el ajuste por rarefacción se realizó sobre un tamaño de muestra de  $N=2$ , un tamaño que, aunque corregido, puede resultar no tan informativo como se desearía debido al pequeño tamaño de muestra utilizada en la corrección.

## CONCLUSIONES

*S. salamandra* es una especie con una elevada diversidad intraespecífica que se ve reflejada en la estructura de la diversidad genética que existe en sus poblaciones. A la escala estudiada aparece una estructuración clara de su diversidad, diferenciándose tres grandes bloques genéticos en el área de estudio, y existen evidencias de una alta estructuración genética a menores escalas. La estructura genética de las poblaciones va a depender de diversos factores, siendo de especial importancia la conectividad entre las mismas a través del movimiento de individuos. Estas tasas de flujo génico determinarán, no sólo la estructura genética de las poblaciones de *S. salamandra*, sino también los niveles de diversidad genética dentro de ellas, y además se verán afectadas por diversos factores ambientales y topográficos como la naturaleza de la matriz de hábitat, la orografía o la existencia de accidentes geográficos importantes. Éstos serán por lo tanto algunos de los elementos que determinen el grado de conectividad entre las poblaciones de especies con una baja capacidad de dispersión como es la salamandra común, y en consecuencia, su estructura genética. Por otro lado, el estudio de esta estructuración de la diversidad también puede ayudarnos en la identificación de las Unidades Evolutivas Significativas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alcobendas, M., H. Dopazo y P. Alberch. 1994. Genetic structure and differentiation in *Salamandra salamandra* populations from the Northern Iberian Peninsula. *Mertensiella*. **4**: 7-23.
- Alcobendas, M., H. Dopazo y P. Alberch. 1996. Geographic variation in allozymes of populations of *Salamandra salamandra* (Amphibia: Urodela) exhibiting distinct reproductive modes. *Journal of Evolutionary Biology*. **9**: 83-102.
- Álvarez, D., M. Choda, L. Viesca, J. M. Cano, M. J. Bañuelos, C. Matsuba, y A. G. Nicieza. Variación genética adaptativa en gradientes altitudinales: efectos sobre la viabilidad de poblaciones subdivididas en escenarios de cambio climático.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste y F. Bonhomme. 2004. Genetix. Populations Genet Software Windows TM Univ Montp. **4 (5)**
- Buckley, D. y M. Alcobendas. 2002. *Salamandra salamandra* En: *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. (Pleguezuelos, J. M., R. Márquez, M. Lizana, eds.). Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española (2ª impresión), Madrid: 55-57.
- Crandall, K. A., O. R. P. Bininda-Emonds, G. M., Mace y R. K. Wayne. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*. **15**: 290-295.
- Cushman, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*. **128**: 231–240.
- Davic, R. D. y H. H. Welsh. 2004. On the Ecological Roles of Salamanders. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **35**: 405–434.
- Dopazo, H., P. Alberch. 1994. Preliminary results on optional viviparity and intrauterine siblicide in *Salamandra salamandra* populations from Northern Spain. *Mertensiella*. **4**: 125-137.
- Dopazo, H., L. Boto y P. Alberch. 1998. Mitochondrial DNA variability in viviparous and ovoviviparous populations of the urodele *Salamandra salamandra*. *Journal of Evolutionary Biology*. **11**: 365-378.
- Evanno, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. **14**: 2611-2620.

- García-París, M., M. Alcobendas, D. Buckley y D. B. Wake. 2003. Dispersal of viviparity across contact zones in Iberian populations of fire salamanders (*Salamandra*) inferred from discordance of genetic and morphological traits. *Evolution*. **57**: 129-143.
- Giordano, A. R., B. J. Ridenhour y A. Storfer. 2007. The influence of altitude and topography on genetic structure in the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Molecular Ecology*. **16**: 1625–1637.
- Gonser, R. A. y R. V. Collura. 1996. Waste not, want not: toe-clips as a source of DNA. *Journal of herpetology*. **30**: 445-447.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*. **86**: 485-486.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, version 2.9. 3, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. *Lausanne University, Lausanne, Switzerland*.
- Guo, S. W. y E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 361-372.
- Hopkins, W. A. 2007. Amphibians as models for studying Environmental Change. *ILAR Journal*. **48**: 270-277.
- Houlihan, J.E., C. S. Findlay, B. R. Schmidt, A.H.Meyer y S. L. Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*. **404**: 752-755.
- Jensen, J. L., A. J. Bohonak y S. T. Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC genetics*. **6**. 13.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper y T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. **16**: 1099–1106.
- Köhler, G., S. Steinfartz. 2006. A new subspecies of the fire salamander, *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758) from the Tendi valley, Asturias, Spain. *Salamandra*. **42**: 13-20.
- Leberg, P.L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*. **11**: 2445-2449.
- Mohneke, M., y M. Rödel. 2009. Declining amphibian populations and possible ecological consequences – a review. *Salamandra*. **45**: 203–210.
- Moritz, C. 1994. Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. **9**: 373-37.

- Palo, J. U., D. Lesbarreres, D. S. Schmeller, C. R. Primmer, y J. Merilä. 2004. Microsatellite marker data suggest sex-biased dispersal in the common frog *Rana temporaria*. *Molecular Ecology*. **13**: 2865-2869.
- Pritchard, J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. **155**: 945-959.
- Pope, L. C., X. Domingo-Roura, K. Ervenn y T. Burke. 2006. Isolation by distance and gene flow in the Eurasian badger (*Meles meles*) at both a local and broad scale. *Molecular Ecology*. **15**: 371-386.
- Ray, N., A. Lehmann y P. Joly. 2002. Modeling spatial distribution of amphibian populations: a GIS approach based on habitat matrix permeability. *Biodiversity & Conservation*. **11**: 2143-2165.
- Raymond, M y F. Rousset. 1995. An Exact Test for Population Differentiation. *Evolution*. **49**: 1280-1283.
- Rebelo, R. y M. H. Leclair. 2003. Site tenacity in the terrestrial salamandrid *Salamandra salamandra*. *Journal of Herpetology*. **37**: 440-445.
- Reinhardt, T., S. Steinfartz, A. Paetzold, M. Weitere. 2013. Linking the evolution of habitat choice to ecosystem functioning: direct and indirect effects of pond-reproducing fire salamanders on aquatic-terrestrial subsidies. *Oecologia*. **173**: 281-291.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 223-225.
- Schwartz, M. K., G. Luikart y R. Walpes. 2006. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Publications, Agencies and Staff of the U.S. Department of Commerce*. **Paper 482**.
- Smith, M. A., y M. D. Green. 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. *Ecography*. **28**: 110-128.
- Spear, S. F., C. R. Peterson, M. D. Matocq y A. Storfer. 2005. Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology*. **14**: 2553-2564.
- Steinfartz, S., M. Veith y 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*. *Molecular Ecology*. **9**: 397-410.
- Steinfartz, S., D. Küsters y D. Tautz. 2004. Isolation and characterization of polymorphic tetranucleotide microsatellite loci in the Fire salamander *Salamandra salamandra* (Amphibia: Caudata). *Molecular Ecology Notes*. **4**: 626-628.

- Storfer, A., M. A. Murphy, S. F. Spear, R. Holderegger y L. P. Waits. 2010. Landscape genetics: where are we now? *Molecular Ecology*. **19**: 3496–3514.
- Stuart, S.N. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*. **306**: 1783-1786.
- Szpiech, Z. A., M. Jakobsson y N. A. Rosenberg. 2008. ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*. **24**. 2498-2504.
- Thiesmeier, B. y K. Grossenbacher. 2004: *Salamandra salamandra* (LINNAEUS, 1758) – Feuersalamander. in THIESMEIER, B. & K. GROSSENBACHER(eds.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas Bd. 4/IIB Schwanzlurche IIB. – Wiebelsheim (Aula-Verlag). 1059-1132.
- Veith, M., S. Steinfatz, R. Zardoya, A. Seitz y A. Meyer. 1998. A molecular phylogeny of 'true'salamanders (family Salamandridae) and the evolution of terrestriality of reproductive modes. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. **36**: 7-16.
- Velo-Antón, G., J.L. Parra, G. Parra-Olea y K. R. Zamudio. 2013. Tracking climate change in a dispersal-limited species: reduced spatial and genetic connectivity in a montane salamander. *Molecular Ecology*. **22**: 3261–3278.
- Wake, D. B. 1997. Incipient species formation in salamanders of the *Ensatina* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**: 7761-7767.
- Weir, B. S. y C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. **6**: 1358-1370.
- Zamudio, K. R., y A. M. Wicczorek. 2007. Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Molecular ecology*. **16**: 257-274.