

**JOÃO MIGUEL DE BARROS ALEXANDRINO**

**Diversidade Genética e Morfológica na  
Salamandra-lusitânica, *Chioglossa lusitanica*  
(Amphibia: Urodela)**

Biogeografia Histórica, Implicações  
Taxonómicas e Conservação

PORTO  
2000

**JOÃO MIGUEL DE BARROS ALEXANDRINO**

**Diversidade Genética e Morfológica na  
Salamandra-lusitânica, *Chioglossa lusitanica*  
(Amphibia: Urodela)**

Biogeografia Histórica, Implicações  
Taxonómicas e Conservação

PORTO  
2000

**JOÃO MIGUEL DE BARROS ALEXANDRINO**

BOLSEIRO DA FUNDAÇÃO PARA A CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
NO DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA E ANTROPOLOGIA DA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO  
(BOLSA PRAXIS XXI BD/5917/95)

**Diversidade Genética e Morfológica na  
Salamandra-lusitânica, *Chioglossa lusitanica*  
(Amphibia: Urodela)**

Biogeografia Histórica, Implicações  
Taxonómicas e Conservação.

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências da Universidade do Porto para  
obtenção do grau de Doutor em Biologia

PORTO  
2000

---

## **Nota Prévía**

Na elaboração desta dissertação, e nos termos do nº 2 do Artigo 8º do Decreto Lei nº 388/70, foi efectuado o aproveitamento total de resultados de trabalhos já publicados, os quais integram alguns capítulos da presente dissertação.

Em todos estes trabalhos, o candidato participou na obtenção, análise e discussão dos resultados, bem como na elaboração da sua forma publicada.

---

**À minha família**

---

# Índice

	Pág.
Agradecimentos	1
Resumo	5
Abstract	8
Resumé	11
<b>1. Introdução Geral</b>	<b>15</b>
1.1. Estudo da diversidade genética em populações naturais	16
1.2. Diversidade genética e conservação	18
1.3. A espécie em estudo: <i>Chioglossa lusitanica</i>	19
1.4. Objectivos e organização temática	21
1.5. Referências bibliográficas	24
<b>2. Diversidade Genética</b>	<b>31</b>
<b>Artigo I:</b> Genetic variation in some populations of the golden-striped salamander, <i>Chioglossa lusitanica</i> (Amphibia: Urodela), in Portugal. J. Alexandrino, N. Ferrand, J.W. Arntzen (1997). <i>Biochemical Genetics</i> , <b>35</b> , 371-381.	33
<b>Artigo II:</b> Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, <i>Chioglossa lusitanica</i> (Amphibia: Urodela). J. Alexandrino, E. Froufe, J.W. Arntzen, N. Ferrand (2000). <i>Molecular Ecology</i> , <b>9</b> , 771-781.	45
<b>Artigo III:</b> Nested clade analysis of phylogeographic data in the golden-striped salamander, <i>Chioglossa lusitanica</i> (Amphibia: Urodela). J. Alexandrino, J.W. Arntzen, N. Ferrand. <i>Submetido</i> .	57

---

<b>Artigo IV:</b> Allozyme variation in the contact zone of two genetically distinct groups of the golden-striped salamander <i>Chioglossa lusitanica</i> (Amphibia: Urodela), with the description of a new subspecies.	75
J. Alexandrino, J.W. Arntzen, N. Ferrand. <i>Em preparação.</i>	
<b>3. Diversidade Fenotípica</b>	<b>89</b>
<b>Artigo V:</b> Morphological variation in two genetically distinct groups of the golden-striped salamander, <i>Chioglossa lusitanica</i> (Amphibia Urodela).	91
J. Alexandrino, N. Ferrand, J.W. Arntzen. <i>Submetido.</i>	
<b>4. Padrões Biogeográficos e Conservação</b>	<b>105</b>
<b>Artigo VI:</b> The historical biogeography and conservation of the Golden-striped salamander ( <i>Chioglossa lusitanica</i> ): Integrating ecological and genetic data.	107
J. Alexandrino, J. Teixeira, J.W. Arntzen, N. Ferrand. <i>Em preparação.</i>	
<b>5. Discussão Geral</b>	<b>121</b>
5.1. Diversidade genética	121
5.1.1. A descoberta de duas unidades populacionais geneticamente distintas	121
5.1.2. A zona de contacto entre duas unidades populacionais distintas	128
5.2. Interpretação biogeográfica dos padrões de diversidade genética	131
5.3. Diversidade fenotípica	134
5.4. História das populações, biogeografia actual e conservação	137
5.5. Implicações taxonómicas	144
5.6. Considerações finais	146
5.7. Referências bibliográficas	150
<b>5. Conclusões</b>	<b>159</b>

---

## Agradecimentos

Ao concluir este trabalho, não posso deixar de manifestar o meu profundo agradecimento a todos aqueles que foram importantes na prossecução do projecto de doutoramento e desta dissertação, através do seu apoio científico e técnico ou dos não menos importantes, estímulo, camaradagem e amizade.

Em primeiro lugar, quero aqui expressar um agradecimento muito especial ao Professor Doutor Nuno Ferrand de Almeida que, como coordenador do Projecto de Investigação “Distribuição e Conservação de *Chioglossa lusitanica*, em Portugal”, resultante de um protocolo entre o Instituto de Zoologia “Dr. Augusto Nobre” da Faculdade de Ciências do Porto e o Instituto da Conservação da Natureza (ICN), e cofinanciado pelo programa LIFE, me proporcionou a oportunidade de iniciar uma actividade científica, não só na área da Herpetologia mas também, e acima de tudo, me permitiu tomar contacto com a apaixonante área da Biologia Evolutiva. Como meu orientador, ao longo do trabalho realizado, realço o seu grande interesse e dedicação, expressos pelo apoio e pelos preciosos ensinamentos prestados com um entusiasmo, por vezes contagiante, e que se revelaram cruciais para a realização de um trabalho válido.

Ao meu co-orientador, Doutor Jan Willem Arntzen agradeço as várias sugestões apresentadas na elaboração do plano de trabalho, toda a informação e documentação facultadas, os ensinamentos prestados e o acompanhamento em algumas sessões de amostragem. A sua lógica apurada e o seu poder de síntese terão sido essenciais na minha formação como investigador científico. Por outro lado, teve uma acção predominante na atmosfera científica que se viveu na Unidade de Genética Animal e Conservação do CECA, em Vairão, entre 1997 e 2000.

Agradeço, também, ao meu irmão, Prof. Doutor Paulo Alexandrino, pelo apoio e interesse demonstrados ao longo do trabalho bem como pela discussão de resultados e por todas as sugestões apresentadas.

---

Ao Professor Doutor David Wake por me ter recebido no “Museum of Vertebrate Zoology”, na Universidade da Califórnia, Berkeley, para uma visita de um mês, que me permitiu interagir com toda a sua equipa de investigação, discutindo não só o meu trabalho como alguns aspectos específicos da Biologia Evolutiva.

No âmbito da minha visita a Berkeley, quero expressar o meu profundo agradecimento ao Mário Garcia-Paris e à Gabriela Parra Olea que me receberam com extrema amizade e me iniciaram nas técnicas de sequenciação automática de DNA.

Ao Professor Doutor Craig Moritz por me ter recebido no “Department of Zoology and Entomology”, na Universidade de Queensland, para uma curta visita que me permitiu adquirir uma outra perspectiva da integração do conhecimento dos padrões filogeográficos de várias espécies numa determinada região, e a sua aplicação para definir áreas importantes para a conservação da biodiversidade.

Ao Prof. Doutor Eduardo Crespo e Doutor Octávio Paulo, por me terem recebido do Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências de Lisboa, onde realizei as primeiras experiências de sequenciação DNA.

Neste âmbito, quero agradecer em especial à Raquel Godinho, que orientou estas primeiras experiências de sequenciação de DNA, e também à Cristina, ao Zé Carlos e ao Rui Rebelo, pelo apoio e camaradagem demonstrados.

Ao Doutor David Tarkhnishvili, por ter possibilitado a expedição às montanhas do Pequeno Cáucaso, onde pudemos observar e recolher amostras de uma salamandra filogeneticamente próxima da Salamandra-lusitânica, a Salamandra do Cáucaso (*Mertensiella caucasica*), e pelo apoio prestado nas minhas primeiras experiências de extracção de DNA e amplificação de um fragmento específico do DNA mitocondrial de *Chioglossa*.

Ao Doutor Humberto Rosa e outros membros da direcção da Sociedade Portuguesa de Herpetologia agradeço a oportunidade de continuar a minha actividade associativa, tão importante na minha formação pessoal, bem como de estar integrado num fórum de permanente discussão global da Herpetologia.

---

A todos os meus colegas da Unidade de Genética Animal e Conservação, em Vairão, com quem partilhei a “aventura e o risco” de trabalhar em Genética e Evolução, agradeço toda a camaradagem demonstrada, assim como a contribuição de todos para um excelente ambiente de trabalho. Em especial, quero expressar o meu agradecimento:

- à Elsa Froufe que, no âmbito do seu estágio de licenciatura, comigo partilhou uma etapa importante do trabalho de campo e laboratorial, revelando-se extremamente eficiente e boa companheira;

- à Marisa Azevedo, pelo trabalho laboratorial que desenvolveu e por todo o seu esforço permanente de organização dos laboratórios;

- aos meus colegas estudantes de doutoramento Madalena Branco, Paulo Célio Alves e Agostinho Antunes, pela cumplicidade de fazermos parte da mesma aventura que representa um projecto de doutoramento, em especial à Madalena por todo o interesse e apoio demonstrados, e ao Agostinho pelas “aventuras no continente americano”!

Não poderia deixar de agradecer também ao Fernando Sequeira e ao José Teixeira, meus camaradas no Projecto “*Chioglossa lusitanica*” e companheiros da aventura inesquecível nas montanhas do Pequeno Cáucaso e nas margens do Mar Negro, na Geórgia, pela excelente colaboração desenvolvida ao longo de todo o trabalho na Salamandra-lusitânica.

Ao meu colega Zé Paulo por me ter facilitado a amostragem no Parque Natural da Serra da Estrela, e ao Paulo Gandra (e ao meu irmão Paulo) por me ter conduzido à localidade de Mota, perto do rio Douro, onde pudemos observar e recolher “dezenas” de salamandras.

Ao FCAV (Futebol Clube dos Aprisionados de Vairão) e ao CPAAV (Clube de Pólo Aquático dos Aprisionados de Vairão) que me proporcionaram momentos de excelente convivência e actividade física (!!!), importantes para manter uma desejada sanidade mental!

O meu último, mas especial, agradecimento vai para toda a minha família e amigos, especialmente para a Claudia e para os meus pais, por todo o apoio e compreensão demonstrados ao longo de todo o trabalho.

---

Desejo, também, agradecer às seguintes entidades:

- Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo apoio e incentivo que a concessão de uma Bolsa de Doutoramento representou;

- Electricidade de Portugal (EDP), pela preciosa colaboração que manteve com o projecto de investigação através da cedência de uma viatura todo o terreno;

- Parque Nacional da Peneda-Gerês pela a disponibilização de alojamento em algumas sessões de recolha;

- Câmara Municipal da Lousã pela colaboração prestada na disponibilização de alojamento numa das sessões de amostragem e por ter facilitado o nosso acesso à mina da ribeira da Sardeira.

---

## Resumo

A salamandra-lusitânica (*Chioglossa lusitânica*) é uma espécie endémica que habita as margens de pequenos e médios cursos de água em zonas moderadamente montanhosas do noroeste da Península Ibérica. Este salamandrídeo é considerado ameaçado pelo “IUCN Red List Data Book”. Os padrões de variação genética em *C. lusitânica* foram investigados através de sete *loci* aloenzimáticos polimórficos e do gene do citocromo *b* do DNA mitocondrial em 17 populações de toda a área de distribuição da espécie. As estimativas obtidas para a diversidade genética aloenzimática revelaram um elevado grau de subdivisão genética ( $F_{ST} = 0.68$ ), justificado fundamentalmente pela existência de dois grupos de populações geneticamente diferenciados. Os dois grupos distribuem-se, respectivamente, para sul (grupo 1) e para norte (grupo 2) do rio Mondego, indicando a coincidência deste rio com uma barreira geográfica histórica para a espécie. Paralelamente, observou-se um decréscimo significativo da variabilidade genética a norte do Mondego, especialmente para norte do rio Douro, associado com os rios Douro e Minho. O padrão geográfico da variação genética e o nível de diferenciação encontrados são compatíveis com as seguintes hipóteses: i) subdivisão da distribuição ancestral da espécie num período anterior ao Pleistoceno Médio; ii) contacto secundário entre populações representativas de refúgios históricos distintos iii) expansão geográfica relativamente recente originando a parte setentrional da distribuição actual da espécie; e iv) perda de variabilidade genética através de “efeito de fundador” durante a expansão geográfica, associada ao atravessamento de grandes eixos fluviais.

A variação genética ao nível do DNA mitocondrial foi analisada através de sequenciação de parte do gene do citocromo *b* e da “análise de clados agrupados”, investigando os processos evolutivos determinantes da distribuição geográfica da diversidade do DNA mitocondrial em *C. lusitânica*. Uma associação significativa foi observada entre a diversidade genética e a sua distribuição geográfica. Os padrões geográficos observados foram explicados por processos de fragmentação histórica e de fluxo génico limitado. As inferências efectuadas revelaram-se concordantes com hipóteses avançadas previamente, com base em dados

---

aloenzimáticos, implicando um processo antigo de fragmentação e contacto secundário numa zona próxima do rio Mondego. Uma expansão geográfica recente revelou-se compatível com a variação observada no DNA mitocondrial, mas não foi inferida através da “análise de clados agrupados”, provavelmente devido aos baixos níveis de divergência nucleotídica observados nas populações localizadas a norte do rio Douro.

Sete *loci* aloenzimáticos polimórficos foram usados para descrever variação genética nuclear na zona de contacto secundário entre os dois grupos populacionais geneticamente diferenciados. Foi observado um padrão de intergradação para quatro *loci* diagnósticos (*ADH*, *PEP-C*, *PEP-D* and *PGM-1*), numa zona com 15-21 km, sugerindo hibridação e introgressão entre os dois grupos. Foi observado um padrão assimétrico de introgressão tanto entre *loci* nucleares como entre *loci* nucleares e citoplasmáticos. A ausência de desequilíbrio gamético entre os *loci* diagnósticos sugere que não existem barreiras genéticas à miscigenação. A presença de populações do grupo 2 a sul do rio Mondego mostrou que este rio não representa uma barreira absoluta para a dispersão de *C. lusitanica*. No entanto, a introgressão é espacialmente limitada por uma zona de habitat desfavorável associada com o vale do Mondego.

A análise de variação morfométrica e do padrão de coloração dorsal em *C. lusitanica* permitiu revelar padrões geográficos concordantes com a diferenciação genética entre dois grupos populacionais separados pelo Mondego. O comprimento dos dígitos em salamandras de populações localizadas a sul do vale do Mondego foi menor do que em salamandras de populações para norte do Mondego. Um padrão de variação clinal foi observado em sobreposição a esta dicotomia, com as dimensões dos membros e dos dígitos a aumentarem de sul para norte. Adicionalmente, a variabilidade do padrão de coloração revelou semelhanças com a variação genética, na zona de contacto entre o grupo 1 e o grupo 2 e nas populações do grupo 2. Processos históricos de isolamento geográfico, miscigenação na zona de contacto secundário e deriva genética associada a um processo de expansão, poderão explicar os paralelos observados entre a variação genética e morfológica. Por outro lado, limitações à evolução de um tipo eco-morfológico especializado poderão explicar o facto de as populações de *C.*

---

*lusitanica* apresentarem uma diferenciação morfológica reduzida comparativamente aos níveis de diferenciação genética observados.

A integração da modelação ecológica da distribuição geográfica e da análise multivariada da diversidade genética (dados aloenzimáticos) permitiu reforçar e reinterpretar as hipóteses formuladas para a biogeografia histórica de *C. lusitanica*, nomeadamente, a associação do vale do Mondego a uma subdivisão histórica da distribuição da espécie e um processo recolonização pós-glaciar. Discrepâncias entre a modelação bioclimática e a distribuição actual da espécie sugerem que a espécie possa não ter atingido os limites ecológicos da sua distribuição, no nordeste da Península Ibérica, e que o processo de expansão geográfica não tenha ainda terminado. Com base na análise biogeográfica integrada, tendo em contra processo históricos e actuais, propõe-se a identificação de duas “Unidades Evolutivas Significativas” para a conservação de *C. lusitanica*, e sugere-se que esta informação seja considerada na definição de áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade na Península Ibérica.

As duas unidades populacionais distintas de *C. lusitanica* não atingiram um nível de isolamento genético compatível com um estatuto de espécie. No entanto, com base numa longa história de evolução independente, nos baixos níveis de introgressão observados e em variação morfológica concordante (ainda que reduzida), propõe-se o reconhecimento de duas subespécies distintas em *C. lusitanica*.

---

## Abstract

The Golden-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*) is an endemic streamside species inhabiting mountainous areas in the northwestern Iberian Peninsula. This Salamandrid is considered to be threatened in the IUCN Red List Data Book. Patterns of genetic variation were assessed at seven polymorphic enzyme *loci* and one mtDNA marker (cytochrome *b*) in 17 populations across its range. Estimates of enzyme genetic diversity revealed a high degree of genetic subdivision ( $F_{ST} = 0.68$ ), mainly attributable to the existence of two groups of populations. The groups were located respectively north and south of the Mondego River, indicating that this river coincided with a major historical barrier to gene flow. A significant decrease in genetic variability from the Mondego northwards was associated with the Douro and Minho rivers. MtDNA sequence variation revealed a congruent pattern of two haplotype groups ( $d = 2.2\%$ ), with a geographical distribution resembling that of allozymes. The pattern and depth of genetic variation is consistent with the following hypotheses: i) subdivision of an ancestral range of the species prior to the middle Pleistocene; ii) secondary contact between populations representing historical refugia; iii) relatively recent range expansion giving rise to the northern part of the species range; and iv) loss of genetic variation through founder effects during range expansion across major rivers.

We gathered cytochrome *b* mitochondrial sequence DNA data from samples across the species range and used nested clade distance analysis to assess evolutionary processes explaining the geographical distribution of mtDNA diversity in *Chioglossa lusitanica*. Significant association was observed between genetic structure and geography. The geographical patterns were explained by past fragmentation and restricted gene flow. Inferences were largely concordant with previous hypotheses (from allozyme data) involving an old fragmentation event and secondary contact near the Mondego River. The hypothesized range expansion to the north from a southern refuge was compatible with mtDNA variation, but not inferred from nested clade analysis. This is probably due to the low levels of genetic divergence observed in the northernmost populations.

---

Seven polymorphic enzyme *loci* were used to describe nuclear genetic variation across a secondary contact zone in the salamander *Chioglossa lusitanica* in central Portugal. A northern and a southern form are genetically well differentiated, supporting data previously obtained from mitochondrial DNA and morphology. Four diagnostic *loci* intergradated over a 15-21 km interval, indicating hybridization and introgression between the groups. Position and shape of clines are not concordant when comparing nuclear-nuclear and nuclear-cytoplasmic *loci*. The absence of linkage disequilibrium in populations central to the contact zone indicates that the two forms admix freely. The presence of the northern form south of the Mondego shows that this river is not an absolute barrier to salamander dispersal. Rather, dispersal and introgression appear to be limited by a zone of unfavourable habitat associated with the Mondego river valley.

Morphometric and colour pattern variation in *C. lusitanica* is concordant with genetic differentiation between groups of populations separated by the Mondego River in Portugal. Southern salamanders have shorter digits than those from the north. Clinal variation with increasing limb length, toe- and finger length was found superimposed on this dichotomy, resulting in stepped clines for each of the characters describing appendage size. Genetic variation was paralleled by colour pattern variability in the group 1-2 secondary contact zone and in group 2 populations. We invoke historical processes of vicariant isolation, admixture in a secondary contact zone and genetic drift associated to population bottlenecks to explain the observed parallels. Morphological constraints resulting from a highly specialized niche may explain why genetic subdivision of *C. lusitanica* is not matched by a pronounced morphological differentiation.

The combination of bioclimatic modelling of the species distribution and multivariate analysis of genetic data (allozymes) strengthens previous hypotheses concerning the historical biogeography of *C. lusitanica*: the Pleistocene subdivision of the range of the species and a process of postglacial recolonization. Discrepancies between bioclimatic modelling predictions and the present-day distribution suggest that the species may still be expanding its range northwards. The existence of an expansion front would be an invaluable opportunity to study the expansion process, for monitoring the expansion edge and to evaluate the

---

effects of global climate change. On the basis of integrated information, we propose the identification of two “Evolutionary Significant Units” for the conservation of the species and suggest that this information should be taken into account in defining key areas for conservation in the Iberian Peninsula.

The two units of *C. lusitanica* have not reached the status of full species and we propose that their long-term independent evolution should be taxonomically recognized at the subspecific level.

---

## Résumé

La salamandre du Portugal (*Chioglossa lusitanica*) est endémique du Nord-Ouest de la Péninsule Ibérique et habite aux bords des petites et moyennes rivières dans les régions montagneuses. Cette salamandridée est répertoriée comme une espèce menacée dans le "IUCN Red List Data Book". Nous avons analysé la variation génétique de sept *locus* protéiques et du gène du cytochrome *b* de l'ADN mitochondrial au sein de 17 populations de toute l'aire de répartition de *C. lusitanica*. Les estimations de la diversité génétique ont révélé une subdivision génétique élevée ( $F_{ST} = 0.68$ ), expliqué fondamentalement par l'existence de deux groupes populationnels différenciés. Ces deux groupes se repartissent, respectivement, au sud (groupe 1) et au nord (groupe 2) du Mondego, ce qui suggère que cette rivière correspondrait à une barrière géographique historique pour l'espèce. De façon parallèle, nous avons observé une réduction significative de la variabilité génétique au nord du Mondego, spécialement au nord du Douro, associé avec les rivières Douro et Minho. Le patron géographique de la variation génétique et le taux de différenciation observé sont compatibles avec les hypothèses suivantes: i) subdivision d'une distribution ancestrale de l'espèce avant le Pleistocène Moyen, ii) contact secondaire entre populations représentatives des refuges historiques distincts, iii) expansion géographique récente vers le nord qui est à l'origine de la partie septentrionale de la distribution actuelle de l'espèce, et iv) réduction de la variabilité génétique pendant l'expansion géographique par un effet fondateur associé au franchissement des grandes rivières.

La variation génétique de l'ADN mitochondrial a été analysé par séquençage d'une partie du gène du cytochrome *b* et en utilisant la «nested clade analysis», pour inférer les processus évolutifs déterminants de la répartition géographique de la diversité de l'ADN mitochondrial chez *C. lusitanica*. Une association significative a été observée entre la diversité génétique et sa répartition géographique. Les patrons géographiques observés peuvent être expliqués par des processus de fragmentation historique et de flux génique limité. Les inférences effectuées sont en accord avec les hypothèses avancées sur la variation protéique, impliquant un processus ancien de fragmentation et un contact secondaire dans une

---

région proche du Mondego. Une expansion géographique récente est compatible avec la variation de l'ADN mitochondrial, mais n'est pas inférée par la «nested clade analysis», probablement en raison d'une divergence nucléotidique réduite au sein des populations présentes au nord du Douro.

Nous avons utilisé les mêmes sept *locus* protéiques polymorphiques pour décrire la variation génétique nucléaire dans la région de contact secondaire entre les deux groupes populationnels. Le patron d'intergradation pour quatre *locus* protéiques (*ADH*, *PEP-C*, *PEP-D* et *PGM-1*), observé sur une distance de 15-21 km, suggère l'hybridation et l'introgession entre les deux groupes. Il existe une asymétrie dans l'introgession entre *locus* nucléaires et entre des *locus* nucléaires et cytoplasmiques. L'absence de déséquilibre gamétique entre des *locus* nucléaires suggère l'absence de barrières génétiques entre les populations. La présence de populations du groupe du nord au sud du Mondego a montré que cette rivière ne présente pas une barrière absolue à la dispersion de cette salamandre. Cependant, l'introgession devient limitée dans une zone associée à la vallée du Mondego où l'habitat est défavorable.

L'analyse de variation morphométrique et du patron de coloration dorsale chez *C. lusitanica* a révélé des patrons géographiques concordants avec la différenciation génétique entre les deux groupes populationnels séparés par le Mondego. Les doigts des salamandres des populations au sud de la vallée du Mondego sont plus courts que ceux des salamandres des populations du nord. En plus de cette dichotomie, un patron de variation clinal a été observé, avec une augmentation de la longueur des membres et des doigts vers les populations du nord. De plus, la variabilité du patron de coloration a montré des coïncidences avec la variabilité génétique, dans la région de contact entre le groupe 1 et 2 et dans les populations du groupe 2. Des processus historiques, le mélange dans la région de contact secondaire et la dérive génétique associée à l'expansion géographique, peuvent expliquer les parallélismes entre la variation morphologique et génétique. Autrement, les limitations de l'évolution d'un type éco-morphologique très spécialisé pourraient expliquer les faibles niveaux de différenciation morphologique chez *C. lusitanica* quand ils sont comparés avec la différenciation génétique.

---

L'intégration de la modélisation écologique de la distribution géographique et de l'analyse multivariée de la diversité génétique des *locus* protéiques a permis de renforcer les hypothèses formulées pour l'histoire biogéographique de *C. lusitanica*, notamment, l'association de la vallée du Mondego avec une subdivision historique de la distribution de l'espèce et avec un processus de recolonisation post-glaciaire. Les discordances entre la modélisation bioclimatique et la distribution actuelle de l'espèce suggèrent que l'espèce n'a pas encore atteint les limites écologiques de sa distribution, dans le nord-ouest de la Péninsule Ibérique, et que le processus d'expansion géographique n'est pas encore terminé. Après cette analyse biogéographique intégrée, et en tenant compte des processus historiques et actuels, nous proposons l'identification de deux unités biogéographiques distinctes ou « Evolutionary Significant Units » pour la conservation de *C. lusitanica*, et que cette information soit prise en compte dans la définition des aires prioritaires pour la conservation de la biodiversité au sein de la péninsule.

Les deux groupes populationnels divergents de *C. lusitanica* n'ont pas atteint des niveaux d'isolement génétique compatibles avec des espèces biologiques. Malgré cela, en tenant compte la longue histoire évolutive indépendante, les niveaux réduits d'introgession observés et la variation morphologique concordante, nous proposons la reconnaissance de deux sous-espèces distinctes pour *C. lusitanica*.

# 1. Introdução Geral

O mapeamento geográfico da biodiversidade foi tradicionalmente conseguido através de métodos descritivos que residiam na classificação dos organismos em compartimentos taxonómicos e na representação da sua distribuição geográfica. O conhecimento da biogeografia actual de uma espécie e a combinação de mapas de distribuição para várias espécies é importante para classificar locais ou regiões de acordo com a sua riqueza específica e, deste modo, conseguir planear uma gestão eficiente dos recursos disponíveis (Primack 1993; Gaston & Spicer 1998; Milner-Gulland & Mace 1998). No entanto, existe uma importante limitação subjacente a este tipo de representação: a de revelar uma imagem da biodiversidade que representa apenas um instante na história da maior parte dos organismos vivos, não sendo possível inferir sobre a história das suas populações ou sobre a sua biogeografia histórica. De facto, o conhecimento da distribuição de uma espécie não implica o conhecimento da continuidade espacial e temporal dessa distribuição e, muito menos, da profundidade histórica ou ancestralidade de diferentes grupos populacionais.

As espécies estão sujeitas a um complexo de factores bióticos e abióticos que, juntamente com a capacidade de dispersão intrínseca, determinam a história da sua distribuição e abundância. A existência de flutuações acentuadas na distribuição e abundância parece constituir uma regra para muitos organismos, especialmente se considerarmos períodos históricos com forte actividade geológica ou flutuações climáticas drásticas (Brown & Lomolino 1998). As glaciações do Pleistoceno representam um excelente exemplo dos efeitos de mudanças climáticas drásticas na distribuição das espécies, provocando contracções e expansões generalizadas das áreas de distribuição conforme se sucediam, respectivamente, os períodos de glaciação e de interglaciação (Pielou 1991; Delcourt & Delcourt 1991). Muitas espécies puderam sobreviver em refúgios glaciais, geralmente situados em zonas mais próximas do Equador, menos afectadas pelas condições climáticas adversas, sofrendo frequentemente alterações da sua estrutura populacional, com processos de fragmentação e isolamento geográfico, extinção e recolonização. Os

padrões biogeográficos actuais resultam da forma como os vários organismos responderam à sucessão de flutuações climáticas, especialmente depois da última glaciação há 18.000 anos (Wurm), de acordo com diferentes requisitos ecológicos e capacidades de dispersão. O conhecimento destes padrões históricos torna-se fundamental para estabelecer uma estratégia de conservação de longo prazo que tenha em conta a persistência temporal das espécies em diferentes regiões geográficas.

### **1.1. Estudo da diversidade genética em populações naturais**

O estudo da biodiversidade foi revolucionado, ao longo dos últimos 35 anos, pela possibilidade de observar e interpretar a variação genética existente em populações naturais, contribuindo substancialmente para o conhecimento da história natural das espécies (Avice 1994). Por um lado, o desenvolvimento de técnicas moleculares, que permitiram observar primeiro a expressão fenotípica de determinados genes ao nível de polimorfismos proteicos (Harris 1966; Johnson *et al.* 1966; Lewontin & Hubby 1966) e, mais recentemente, revelar de forma directa a informação genética ao nível das cadeias de DNA citoplasmático e nuclear (Brown & Vinograd 1974; Sanger *et al.* 1977; Mullis *et al.* 1986; Kocher *et al.* 1989). Por outro lado, a utilização de modelos matemáticos que equacionam a acção de forças evolutivas (deriva genética, selecção natural, fluxo génico) sobre a variação genética (gerada essencialmente por mutação e recombinação) transmitida de forma mendeliana, segundo um modelo nulo que assume a neutralidade da variação genética (Kimura 1983), permitiram interpretar os padrões observados como uma consequência do tipo de estruturação espacial das populações, do efectivo populacional e do grau de fluxo génico estabelecido (Wright 1931; Kimura & Ôhta 1971).

A genética populacional tradicional tem a sua base empírica principal no estudo de polimorfismos proteicos, através dos quais é possível separar produtos alélicos distintos por diferenças de carga ou de ponto isoeléctrico e observar a sua frequência em amostras populacionais. Da análise das frequências alélicas obtêm-se estimativas de diferenciação genética entre populações ou espécies, migração

(fluxo génico) entre populações (ver revisões em Slatkin 1987 e Neigel 1997) e, pelo menos potencialmente, flutuações do efectivo populacional (Nei *et al.* 1975; Leberg 1992).

A análise da variação ao nível do DNA, particularmente do DNA mitocondrial, desencadeou uma segunda revolução metodológica no estudo da variação genética, possibilitando conhecer não só a frequência de diferentes alelos, mas também inferir as suas relações filogenéticas. Esta nova perspectiva da variação genética teve grande impacto no estudo da filogenia das espécies e no conhecimento dos processos evolutivos de longo prazo (Avice 1994, 2000), permitindo inclusivamente, embora com algumas limitações, indicar uma cronologia para determinados processos evolutivos (Thorpe 1982; Hillis *et al.* 1997). A nível intraespecífico, a combinação do conhecimento da filogenia e frequência dos alelos e a sua interpretação num contexto geográfico, permitiram revelar aspectos importantes sobre a biogeografia histórica das espécies e sobre os processos de dinâmica populacional históricos e contemporâneos (Avice 1989, 1994; Slatkin 1989; Slatkin & Maddison 1989; Hudson 1990), dando início a uma nova disciplina que se ocupa do estudo intraespecífico (ou em espécies filogeneticamente próximas) da distribuição geográfica e abundância de linhagens evolutivas distintas – a filogeografia (Avice *et al.* 1987; Avice 2000). Nas últimas duas décadas, verificou-se um aumento significativo de estudos de cariz filogeográfico acompanhado pelo desenvolvimento de metodologias de análise que permitiram refinar a interpretação da variação genética molecular, das quais se destacam, por constituírem exemplos importantes, a extensão da teoria da coalescência e a sua aplicação a populações de estrutura e demografia diversa (Hudson 1998), e a criação de métodos estatísticos que permitem testar os padrões filogeográficos, procurando separar processos contemporâneos de processos históricos (“nested clade analysis”; Templeton *et al.* 1995; Templeton 1998).

O conhecimento de padrões filogeográficos para várias espécies permitiu a identificação de linhas evolutivas crípticas e, por vezes, zonas de contacto secundário e/ou de hibridação (e.g. Avice 1994), revelando-se de especial importância em grupos de organismos em que a morfologia é relativamente conservativa (e.g. os anfíbios; McGuigan *et al.* 1998; Tarkhnishvili *et al.* 2000). As

descontinuidades e gradientes identificados, idealmente através de evidência ao nível de vários genes (Avice 1998; Slade & Moritz 1998), podem ser usadas para construir hipóteses sobre eventos biogeográficos, em combinação com informação adicional sobre a “história da paisagem” (e.g., geologia, paleoecologia). A nível regional, o conhecimento de padrões filogeográficos para várias espécies com semelhantes requisitos ecológicos e capacidade de dispersão é fundamental para a generalização de determinada hipótese biogeográfica (Avice 1998; Bermingham & Moritz 1998). Por exemplo, o estudo comparado da influência das flutuações climáticas do Pleistoceno na distribuição da diversidade genética da fauna e flora europeias, combinando uma análise filogeográfica de várias espécies com dados paleontológicos e paleoecogeográficos, permitiu confirmar hipóteses anteriormente formuladas que previam uma redução da diversidade genética em zonas recentemente colonizadas e um aumento da diversidade genética nas áreas que serviram como refúgios glaciais (Hewitt 1996, 1999, 2000). Na Europa, os padrões filogeográficos actuais resultam da forma como as diferentes espécies recuperaram após a última glaciação, das rotas seguidas durante a expansão geográfica subsequente, e das zonas de contacto secundário formadas por linhagens evolutivas que divergiram em diferentes refúgios no Sul da Europa (Taberlet *et al.* 1998). Outros estudos de filogeografia comparada centraram-se principalmente no Sudeste dos Estados Unidos (Bermingham & Avice 1986) e nas florestas tropicais da Austrália (Schneider *et al.* 1998).

## **1.2. Diversidade genética e conservação**

Moritz (1994b, 1995) considera que existem dois níveis de aplicação do conhecimento da diversidade genética para fins de conservação da biodiversidade. O primeiro utiliza a informação sobre a variação genética para estudar fenómenos de dinâmica populacional contemporânea como, por exemplo, definir a escala geográfica apropriada ao estudo de uma população, determinar a origem de indivíduos migradores ou introduzidos, bem como identificar fenómenos populacionais recentes, sejam alterações do efectivo populacional ou processos de fragmentação. O segundo nível consiste na adopção de uma abordagem

filogeográfica para a identificação de populações com histórias evolutivas independentes, que poderão ser classificadas como espécies (Cracraft 1983; Frost & Hillis 1990), subespécies (Avice & Ball 1990; O'Brien & Mayr 1991) ou “Unidades Evolutivas Significativas” (Evolutionary Significant Units – ESU's; Ryder 1986; Moritz 1994a). Embora estes dois planos devam ser complementares, o segundo será porventura fundamental no reconhecimento de unidades intraespecíficas e de processos biogeográficos, importantes para a conservação.

O conceito de ESU pode ser estendido a várias espécies, e até a uma comunidade, através de estudos filogeográficos comparativos. Dada a impossibilidade de estudar todos os organismos de uma determinada região, torna-se importante seleccionar espécies que representem diferentes modelos de requisitos ecológicos e de capacidade de dispersão. Os organismos com capacidade de dispersão reduzida são excelentes modelos para este tipo de estudos pois é provável que os padrões de diversidade genética actuais reflectam mais a história das populações do que fenómenos contemporâneos de dinâmica populacional (Larson *et al.* 1984; Templeton *et al.* 1995). O ideal será estudar diferentes modelos ecológicos que possam representar o maior número de espécies de uma região. Por outro lado, determinadas espécies deverão ser seleccionadas pelo seu estatuto prioritário de conservação.

### 1.3. A espécie em estudo: *Chioglossa lusitanica*

Os anfíbios são organismos de grande sensibilidade ambiental por se situarem, a nível ecológico, num interface entre o meio aquático e o meio terrestre. Por este motivo, pensa-se que poderão ser importantes como indicadores de alterações da qualidade do habitat (Primack 1993). Por outro lado, devido à sua baixa capacidade de dispersão, especialmente no caso das salamandras, são normalmente considerados como excelentes modelos para estudos de biogeografia histórica (Larson 1984; Philips 1994; Templeton *et al.* 1995).

*Taxionomia e macroevolução*

A espécie estudada neste trabalho é um anfíbio urodelo endêmico da Península Ibérica: a Salamandra-lusitânica, *Chioglossa lusitanica* Bocage 1864. *C. lusitanica* constitui um género monoespecífico da família Salamandridae, sendo considerada uma “salamandra legítima” (“true salamander”) à semelhança das espécies dos géneros *Salamandra* e *Mertensiella*. Almaça (1968) em “A Peculiaridade da Fauna Ibérica”, faz uma menção particular a *C. lusitanica* referindo-se-lhe como “um endemismo lusitânico sem afinidades próximas no mundo actual”. O registo fóssil sugere a existência de uma forma ancestral, no Miocénico médio de França (há aproximadamente 15 milhões de anos), denominada *Chioglossa meini*. Alguns autores admitiam que a sua distribuição actual seria o resultado de uma regressão da espécie durante as glaciações do Quaternário (Barbadillo 1987), enquanto outros a consideravam como um endemismo originado ainda no Terciário (Crespo 1979). Estudos recentes sugerem que a espécie filogeneticamente mais próxima de *C. lusitanica* é a Salamandra do Cáucaso, *Mertensiella caucasica* (Titus & Larson 1995; Veith *et al.* 1998). As duas espécies resultariam de um processo de divergência iniciado há aproximadamente 15 milhões de anos, após o isolamento das zonas oriental e ocidental do Mediterrâneo (Veith *et al.* 1998; Oosterbroeck & Arntzen 1992).

*Tipo morfo-ecológico, biogeografia e conservação*

*C. lusitanica* é uma salamandra que habita fundamentalmente as margens de pequenos e médios cursos de água corrente do Noroeste Ibérico. A sua distribuição está circunscrita a zonas de clima temperado, com precipitação anual superior a 1000 mm e altitude inferior a 1200 m, correspondendo a uma área que compreende o Noroeste de Portugal, a Galiza e as Astúrias.

Um conjunto de características peculiares diferencia a salamandra lusitânica de outros salamandrídeos e parece revelar uma convergência singular desta espécie com alguns Pletodontídeos americanos (Arntzen 1994). A ausência de pulmões funcionais, em particular, determina um tipo morfo-fisiológico extremamente dependente de habitats saturados em humidade e restringe a presença de *C. lusitanica* à vizinhança de cursos de água e, por vezes, nascentes,

fontes ou minas de água. Este facto limita ainda mais a capacidade de dispersão desta espécie, que se torna marcadamente direccional, com o fluxo génico entre populações a ocorrer fundamentalmente ao longo dos cursos de água, através dos adultos que seguem a humidade das margens ou por deriva larvar de montante para jusante (Arntzen 1981, 1994; Thiesmeier 1994). Apesar das limitações ecológicas, a existência de condições ambientais favoráveis para *C. lusitanica* no Noroeste Ibérico, e.g. precipitações elevadas e a densa rede de cursos de água, explicam a sua distribuição contínua quando representada numa grelha UTM decaquilométrica (Sequeira *et al.* 1996; Teixeira 1999; Teixeira & Arntzen *submetido*).

O facto de *C. lusitanica* representar um género monotípico, associado a uma elevada sensibilidade ecológica e a uma distribuição geográfica bastante restrita (que, em Portugal, coincide com as regiões mais densamente povoadas pelo Homem e onde a destruição de habitats se tem feito sentir de forma muito marcada), devem ser suficientes para manter uma preocupação de longo prazo sobre o estado das suas populações (Teixeira *et al.* 1999). Assim, é ainda considerada uma espécie **insuficientemente conhecida** no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (SNPRCN 1990), **rara** no Livro Vermelho dos Vertebrados de Espanha (Blanco & González 1992), e com estatuto **indeterminado** a nível da UICN (União Internacional para a Conservação da Natureza). A conservação das populações da salamandra-lusitânica deve ter em conta, de forma paralela, a história das suas populações e da sua biogeografia, permitindo compreender os padrões biogeográficos actuais e prever os futuros, e os processos populacionais contemporâneos decorrentes, quer de fenómenos climáticos naturais, quer da acção do Homem.

#### 1.4. Objectivos e organização temática

O presente trabalho pretende contribuir para o estudo dos padrões filogeográficos na Península Ibérica, da sua história biogeográfica e da conservação da biodiversidade. Esta região representou um refúgio para muitos organismos durante as glaciações do Quaternário, em conjunto com a Península Itálica e a Península Balcânica. No entanto, podemos considerar que a investigação da diversidade

genética tem estado demasiado centrada nos padrões filogeográficos à escala europeia (Hewitt 1996, 1999; Taberlet 1998), em detrimento do estudo mais detalhado dos refúgios glaciários.

O tema principal deste trabalho são os padrões geográficos de diversidade genética ao longo de toda a área de distribuição de *C. lusitanica*, no Noroeste da Península Ibérica. Neste contexto, o estudo da variação de marcadores moleculares nucleares e citoplasmáticos, a sua análise e interpretação, permitiram abordar questões mais específicas sobre a história evolutiva desta espécie: microevolução, biogeografia histórica, diversidade fenotípica, e a sua relevância para conservação da espécie.

*Objectivos específicos:*

- estudo da variação de marcadores genéticos nucleares e citoplasmáticos em populações de *C. lusitanica*, ao longo toda a sua área de distribuição no noroeste da Península Ibérica;
- interpretação biogeográfica, histórica e actual, dos padrões geográficos de diversidade genética;
- estudo paralelo da diversidade fenotípica ao nível de caracteres morfométricos e do padrão de coloração dorsal;
- integração do conhecimento sobre a história das populações de *C. lusitanica* com padrões biogeográficos actuais;
- sugestão de linhas gerais de conservação da espécie considerando os padrões históricos de persistência das populações.

*Organização temática*

Os temas abordados neste trabalho são apresentados sob a forma de seis artigos científicos, quer estes se encontrem já publicados, submetidos para publicação ou em preparação. O primeiro artigo apresenta o trabalho inicial de afinação de sistemas de detecção de polimorfismos proteicos em *C. lusitanica*, que permitiu revelar três sistemas polimórficos na espécie bem como obter uma perspectiva preliminar sobre a distribuição geográfica da diversidade genética. Este trabalho,

publicado na revista *Biochemical Genetics* (Artigo I) foi um avanço importante para o cumprimento dos objectivos propostos, e uma base sólida para o planeamento de todo o projecto, quer no plano do trabalho laboratorial, quer a nível da amostragem populacional.

O segundo artigo foi recentemente publicado na revista *Molecular Ecology* (Artigo II) e é considerado fundamental para o cumprimento dos objectivos propostos. A utilização de marcadores moleculares nucleares (sete sistemas proteicos polimórficos) e citoplasmáticos (DNA mitocondrial – citocromo *b*) permitiu observar padrões de diversidade genética em *C. lusitanica* e construir as primeiras hipóteses sobre a história biogeográfica da espécie, implicando o isolamento histórico de duas unidades populacionais.

O estudo mais detalhado dos padrões filogeográficos ao nível do DNA mitocondrial em *C. lusitanica* possibilitou submeter um terceiro artigo para publicação à revista *Molecular Ecology* (Artigo III). A aplicação de métodos de análise estatística recente permitiu testar a estruturação populacional e separar a história das populações de fenómenos de dinâmica populacional recente (Templeton *et al.* 1995; Templeton 1998), contribuindo para reforçar e refinar hipóteses anteriormente formuladas.

Um fenómeno de microvicariância resultante de flutuações climáticas ocorridas no Pleistoceno terá originado um processo de evolução divergente e a diferenciação de dois grupos de populações de *C. lusitanica* (Artigo II e III). O estudo dos padrões de variação genética na zona de contacto secundário entre estes dois grupos, localizada numa zona próxima do rio Mondego, foi o tema principal de um outro trabalho que se encontra ainda em fase de preparação para publicação (Artigo IV).

Paralelamente ao estudo dos padrões de diversidade genética em *C. lusitanica*, prosseguimos o estudo da sua diversidade fenotípica. Foram analisados padrões de variação em características morfológicas, ao nível de caracteres morfométricos e do padrão de coloração dorsal. Este trabalho permitiu submeter um artigo à revista *Journal of Zoology* (Artigo V) em que é discutida a influência da história das populações, por contraposição à acção de gradientes ambientais e selecção, nos padrões de diversidade fenotípica de *C. lusitanica*.

O último artigo científico que compõe o presente trabalho foi recentemente submetido à revista *Conservation Genetics*, integrando informação ecológica, resultante de um trabalho prévio de modelação ecológica da distribuição da espécie (Teixeira 1999; Teixeira & Arntzen *submetido*), e o conhecimento dos padrões geográficos de diversidade genética de *C. lusitanica*, sintetizados através de análise multivariada e de metodologias geoestatísticas. Mapas sintéticos de diversidade genética permitiram enriquecer o conhecimento da biogeografia actual da espécie através de uma perspectiva da história das suas populações. Esta abordagem integrativa permitiu identificar centros de diferenciação histórica das populações de *C. lusitanica* que deverão ser considerados prioritários para a conservação da espécie.

### 1.5. Referências bibliográficas

- Almaça C (1968) A peculiaridade da fauna ibérica (vertebrados terrestres). *Revista da Faculdade de Ciências de Lisboa*, 2ª série, **15**, 209-231.
- Arntzen JW (1981) Ecological observations on *Chioglossa lusitanica* (Caudata, Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, **1**, 187-203.
- Arntzen JW (1994) Speedy salamanders: sedentariness and migration of *Chioglossa lusitanica*. *Revista Española Herpetologia*, **8**, 81-86.
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise JC (1989) A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution*, **4**, 279-281.
- Avise JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, **7**, 371-380.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge MA, USA.

- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522.
- Avise JC, Ball RM (1990) Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys of Evolutionary Biology*, **7**, 45-68.
- Barbadillo LJ (1987) *La Guia de Incafo de los Anfibios y Reptiles de la Peninsula Iberica, Islas Baleares y Canarias*. Guias Verdes de Incafo. INCAFO.
- Bermingham E, Avise JC (1986) Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, **113**, 939-965.
- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, **7**, 367-369.
- Blanco, J. C. & Gonzalez, J. L.. (1992). *Libro Rojo de los Vertebrados de España*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion. ICONA. Madrid.
- Brown JH, Lomolino MV (1998) *Biogeography*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland MA., USA.
- Brown WM, Vinograd J (1974) Restriction endonuclease cleavage maps of animal mitochondrial DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **71**, 4617-4621.
- Cracraft J (1983) Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, **1**, 159-187.
- Crespo EG (1979) Contribuição para o conhecimento da biologia dos Alytes ibéricos, *A. obstetricans* boscai Lataste, 1879 e *A. cisternasii* Boscá, 1879 (Amphibia, Salientia): A problemática da especiação de *Alytes cisternasii*. *Tese de doutoramento*. Universidade de Lisboa.
- Delcourt HR, Delcourt PA (1991) *Quaternary Ecology: a paleoecological perspective*. Chapman & Hall, London, UK.

- Frost DR, Hillis DM (1990) Species in concept and practice: herpetological applications. *Herpetologica*, **46**, 87-104.
- Gaston KJ, Spicer JI (1998) *Biodiversity: an introduction*. Blackwell Science Ltd, London, UK.
- Harris H (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **164**, 298-310.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907-913.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK (1997) *Molecular Systematics*, 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland MA, USA.
- Hudson RR (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, **7**, 1-44.
- Hudson RR (1998) Island models and the coalescent process. *Molecular Ecology*, **7**, 413-418.
- Johnson FM, Kanapi CG, Richardson RH, Wheeler MR, Stone WS (1966) An analysis of polymorphisms among isozyme *loci* in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **56**, 119-125.
- Kimura M, Ohta T (1971) *Theoretical aspects of population genetics*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.
- Kimura M (1983) *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, England.

- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca X, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **86**, 6196-6200.
- Larson A (1984) Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae. *Evolutionary Biology*, **17**, 119-217.
- Larson A, Wake DB, Yanev KP (1984) Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics*, **106**, 293-308
- Leberg PL (1992) Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, **42**, 447-494.
- Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudobscura*. *Genetics*, **74**, 175-195.
- McGuigan K, McDonald K, Parris K, Moritz C (1998) Mitochondrial DNA diversity and historical biogeography of a wet forest-restricted frog (*Litoria pearsoniana*) from mid-east Australia. *Molecular Ecology*, **7**, 175-186.
- Milner-Gulland EJ, Mace R (1998) *Conservation of biological resources*. Blackwell Science Ltd, London, UK.
- Moritz C (1994a) Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375.
- Moritz C (1994b) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, **3**, 401-411.
- Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **B**, **349**, 113-118.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symposium of Quantitative Biology*, **51**, 263-273.

- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, **29**, 1-10.
- Neigel JE (1997) A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 105-128.
- O'Brien SJ, Mayr E (1991) Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. *Science*, **251**, 1187-1188.
- Oosterbroeck P, Arntzen JW (1992) Area-cladograms of circum-Mediterranean taxa in relation to Mediterranean palaeogeography. *Journal of Biogeography*, **19**, 3-20.
- Pielou (1991) *After the Ice Age: the return of life to glaciated North America*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Phillips CA (1994) Geographic distribution of mitochondrial DNA variants and the historical biogeography of the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Evolution*, **48**, 597-607.
- Primack RB (1993) *Essentials of conservation biology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland MA., USA.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, **1**, 9-10.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **74**, 5463-5467.
- Schneider CJ, Cunningham M, Moritz C (1998) Comparative mtDNA phylogeography and the history of endemic vertebrates in the Wet Tropics rainforests of Australia. *Molecular Ecology*, **7**, 487-498.
- Sequeira F, Teixeira J, Alexandrino J, Lima V, Ferrand N (1996) Distribución de *Chioglossa lusitanica* (Bocage, 1864) en Portugal. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, **7**, 7.

- Slade RW, Moritz C (1998) Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced range. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **265**, 769-777.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**, 787-792.
- Slatkin M (1989) Detecting small amounts of gene flow from phylogenies of alleles. *Genetics*, **121**, 609-612.
- Slatkin M, Maddison WP (1989) A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics*, **123**, 603-613.
- SNPRCN (1990). *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Secretaria de Estado do Ambiente e Defesa do Consumidor. SNPRCN. Lisboa.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A, Cosson J (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- Tarkhnishvili DN, Thorpe RS, Arntzen JW (2000) Pre-Pleistocene refugia and differentiation between populations of the Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**, 414-422.
- Teixeira J (1999) Biogeografia de Salamandra-lusitânica: utilização de Sistemas de Informação Geográfica na modelação da distribuição. *Tese de Mestrado*. Universidade do Porto.
- Teixeira J, Sequeira F, Alexandrino J, Ferrand (1999) Bases para a Conservação da Salamandra-lusitânica (*Chioglossa lusitanica*). *Estudos de Biologia e Conservação da Natureza*, **22**, 1-34. Instituto da Conservação da Natureza, Ministério do Ambiente, Lisboa.
- Teixeira J, Arntzen JW. Biogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*: a field survey and spatial modelling approach. *Submetido para publicação*.

- Templeton AR (1998) Nested clade analysis of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**, 381-397.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**, 767-782.
- Thiesmeier B (1994) Trophische Beziehungen und Habitatpräferenzen sympatrisch lebender *Salamandra salamandra* und *Chioglossa lusitanica*-Larven. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde*, **17**, 119-126.
- Thorpe JP (1982) The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **13**, 139-168.
- Titus TA, Larson A (1995) A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary radiation of the salamander family Salamandridae. *Systematic Biology*, **44**, 125-151.
- Veith M, Steinfartz S, Zardoya R, Seitz A, Meyer A (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.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.

## 2. Diversidade Genética

- I** Genetic variation in some populations of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela), in Portugal.

J. Alexandrino, N. Ferrand, J.W. Arntzen (1997). *Biochemical Genetics*, **35**, 371-381.

- II** Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela).

J. Alexandrino, E. Froufe, J.W. Arntzen e N. Ferrand (2000). *Molecular Ecology*, **9**, 771-781.

- III** Nested clade analysis of phylogeographic data in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela).

J. Alexandrino, J.W. Arntzen, N. Ferrand. *Submetido*.

- IV** Allozyme variation in the contact zone of two genetically distinct groups of the golden-striped salamander *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela), with the description of a new subspecies.

J. Alexandrino, J.W. Arntzen, N. Ferrand. *Em preparação*.

Biochemical Genetics, Vol. 35, Nos. 11/12, 1997

## Genetic Variation in Some Populations of the Golden-Striped Salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela), in Portugal

João Alexandrino,<sup>1,2,4</sup> Nuno Ferrand,<sup>1,2</sup> and J. W. Arntzen<sup>3</sup>

Received 21 Aug. 1997—Final 29 Sept. 1997

*Genetic variation in the golden-striped salamander (Chioglossa lusitanica) was assessed in 231 individuals from four Portuguese populations by means of horizontal starch gel electrophoresis and isoelectric focusing. Three of 19 enzyme systems, representing 21 presumptive loci, were found to be polymorphic: phosphoglucomutase 1 (PGM1), peptidase B (PEPB), and peptidase D (PEPD). The observed average heterozygosity in Chioglossa lusitanica (0.027) is significantly lower than that observed for other amphibians, either urodeles or salamanders. Differences in allele frequencies and the presence of private alleles are indicative of a high degree of population differentiation. PEPD, in particular, seems to be a diagnostic locus separating the southernmost population studied from the others.*

**KEY WORDS:** Amphibia; polymorphism; golden-striped salamander; *Chioglossa lusitanica*; Urodela; starch gel electrophoresis; isoelectric focusing.

### INTRODUCTION

The golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* Bocage (1864), is a peculiar amphibian species belonging to a monospecific genus of the family Salaman-

<sup>1</sup> Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Praça Gomes Teixeira, 4050 Porto, Portugal.

<sup>2</sup> Centro de Estudos em Ciência Animal, ICETA, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte (Craço)—Vairão, 4480 Vila do Conde, Portugal.

<sup>3</sup> School of Biological Sciences, University of Wales, Brambell Building, Bangor LL57 2UW, United Kingdom.

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed at Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Praça Gomes Teixeira, 4050 Porto, Portugal.

dridae. It constitutes an endemism circumscribed to the northwestern part of the Iberian Peninsula and its closest relative may be *Mertensiella caucasica*, from the Caucasus. The evolutionary relationships of these and other salamandrids are currently under discussion (Titus and Larson, 1995).

Studies undertaken over the last decades (Goux, 1957; Arntzen, 1981, 1994a,b, 1995; Vences, 1990) represent a major advance in the knowledge on the ecology and reproduction of *C. lusitanica*. In particular, a suite of morphophysiological characteristics seems to determine an extreme dependence on humidity, which, in spite of the terrestriality of this species, may result in a low dispersal ability. These facts raise some questions about the genetic structure of its populations such as the possibility of a strong population differentiation between river basins. However, the absence of information on the genetic variability in populations of *C. lusitanica* has prevented any analysis of this kind.

The present paper describes three genetic polymorphisms in *C. lusitanica* and reports the gene frequencies and average heterozygosity obtained for four populations in Portugal.

#### MATERIALS AND METHODS

Four distinct sampling sites were chosen in northern, central, and southern parts of the *C. lusitanica* distribution area in Portugal (Fig. 1). A total of 231 salamanders was collected between September 1994 and August 1995: 38 individuals from Serra do Gerês (population of Ribeiro de Chedas), 93 from Serra de Sta Justa (population of Ribeira da Silveirinha), 37 from Serra de Montemuro (population of the adjoining brooks of Ribeiro de Enxedrô and tributary of Ribeira de Bestança), and 63 from Serra da Lousã (population of Ribeira do Vilarinho and Ribeira da Sardeira).

Tissue samples were obtained by removing the tail end of each salamander (by autotomy) and subsequently freezing them at  $-20^{\circ}\text{C}$ . A tissue extract was obtained by grinding a portion of the tail in distilled water (1:3, w/v). The homogenate was centrifugated at 13,000 rpm for 7 min at  $0^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was decanted and applied either on starch gels for electrophoresis (SGE) or on polyacrylamide gels for isoelectric focusing (IEF).

A survey of the genetic variability of *C. lusitanica* was performed for 19 enzyme systems representing 21 structural loci through starch gel horizontal electrophoresis and isoelectric focusing techniques (see Table I). Eighteen were found to be monomorphic and three (phosphoglucomutase 1, peptidase B, and peptidase D) were found to show variation. Table I lists the enzyme systems examined, abbreviations used, and technical details for electrophoresis and staining.

Three buffer systems were used in starch gel electrophoresis: SGE1, citrate-NaOH-His/HCl, pH 6.0 (Ferrand and Amorim, 1990); SGE2, Tris-citrate buffer,

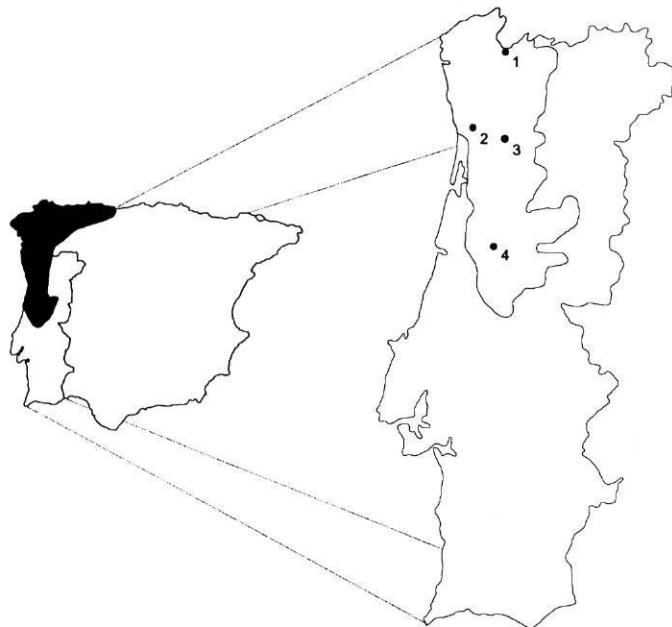


Fig. 1. Maps showing the Iberian distribution of *Chioglossa lusitanica* and the collection sites in Portugal. 1, Gerês; 2, Sta Justa; 3, Montemuro; 4, Lousã.

pH 7.6 (Amorim and Siebert, 1982); and SGE3, Tris- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.6, according to Povey *et al.* (1972) with modifications (Ferrand, 1995). The tissue extracts were always applied in a mixture of 1:1 in Sephadex (PHARMACIA).

Protein separation by conventional isoelectric focusing was performed in polyacrylamide gels (5% = T, 3% = C, 20% saccharose;  $230 \times 100 \times 0.3$  mm). Gel polymerization was achieved in 1 hr at room temperature by adding 0.1% (v/v) TEMED and 0.7% (v/v) of a 0.44 M ammonium persulfate (APS) solution. For the separation of ME, NP, CK, GALT, ADA, and GPI (IEF1), a pH gradient was established using the ampholytes 3.5–10 Ampholine (Pharmacia) at a final concentration of 6% (v/v). Phosphoric acid, 0.25 M, and sodium hydroxide, 1 M, were used as electrode anode and cathode solutions, respectively. Gels were prefocused for 1 hr. After prefocusing 8  $\mu\text{l}$  of tissue extract was applied to the gel using a silicone strip (Serva) placed 1.5 cm from the cathode. Focusing was then performed for 3 hr. For the separation of *PGM1* and *PEPB* (IEF2), a pH gradient was established using a 2:3 mixture of the ampholytes 5–6 Pharmalyte and 5–8 Pharmalyte (2:3) at a final concentration of 5% (v/v). Aspartic acid, 0.04 M, and NaOH, 1 M, were used as anode and cathode solutions, respectively. Gels were prefocused for 1 hr. After prefocusing, 8  $\mu\text{l}$  of tissue extract was applied to the gel in a silicone strip 1.5 cm from the cathode. Focusing was performed for 3 hr.

**Table I.** Enzyme Systems Analyzed for Genetic Variation in *Chioglossa lusitanica*<sup>a</sup>

Enzyme/locus	EC	Sample size	Electrophoretic system	Staining <sup>b</sup>	Variation
Lactate dehydrogenase ( <i>LDH</i> )	1.1.1.27	20	EF1, EF2	1	No
Malate dehydrogenase ( <i>MDH</i> )	1.1.1.37	14	EF1, EF2	1	No
Malic enzyme ( <i>ME1/ME2</i> )	1.1.1.40	22	EF1, EF2, IEF1	1	No
Isocitrate dehydrogenase ( <i>IDH</i> )	1.1.1.42	18	EF1, EF2	1	No
6-Phosphogluconate dehydrogenase ( <i>PGD</i> )	1.1.1.44	14	EF1	1	No
Nucleoside phosphorylase ( <i>NP</i> )	2.4.2.1	27	EF2, IEF1	1	No
Glutamate pyruvate transaminase ( <i>GPT</i> )	2.6.1.2	11	EF2	1	No
Hexokinase ( <i>HK</i> )	2.7.1.1	12	EF1, EF2	1	No
Pyruvate kinase ( <i>PK</i> )	2.7.1.40	12	EF1	1	No
Adenilate kinase ( <i>AK</i> )	2.7.4.3	12	EF1, EF2	1	No
Creatine kinase ( <i>CK1/CK2</i> )	2.7.3.2	29	EF2, IEF1	1	No
Phosphoglucomutase ( <i>PGM1</i> )	2.7.5.1	231 <sup>c</sup>	IEF2	2	Yes
Galactose-1-phosphate uridyl transferase ( <i>GALT</i> )	2.7.7.12	25	EF1, IEF1	1	No
Peptidase A ( <i>PEPA</i> )	3.4.11	34	EF2	1	No
Peptidase B ( <i>PEPB</i> )	3.4.11	136 <sup>c</sup>	IEF2	3	Yes
Peptidase C ( <i>PEPC</i> )	3.4.11	34	EF2	1	No
Peptidase D ( <i>PEPD</i> )	3.4.13.9	130 <sup>c</sup>	EF3	4	Yes
Adenosine deaminase ( <i>ADA</i> )	3.5.4.4	19	EF2, IEF1	1	No
Glucosephosphate isomerase ( <i>GPI</i> )	5.3.1.9	21	EF1, IEF1	1	No

<sup>a</sup>System (see text for details): SGE, starch gel electrophoresis; SGE1, citrate-NaOH-His/HCl, pH 6.0 (Ferrand and Amorim, 1990); SGE2, Tris-citrate buffer, pH 7.6 (Amorim and Siebert, 1982); SGE3, Tris-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.6, according to Povey *et al.* (1972) with modifications (Ferrand, 1995). IEF: Isoelectric focusing performed in polyacrylamide gels (5% T, 3% C, 20% saccharose; 230 × 100 × 0.3 mm); IEF1, gels with 6% (v/v) of ampholytes 3.5–10 Ampholine (Pharmacia); EF2, gels with 5% (v/v) of a 2:3 mixture of the ampholytes 5–6 Pharmalyte and 5–8 Pharmalyte.

<sup>b</sup>1, Harris and Hopkinson (1976); 2, modified from Spencer *et al.* (1964); 3 and 4, modified from Lewis and Harris (1967), using leucylglycylglycine as PEPB substrate and phenylalanylproline as PEPD substrate.

<sup>c</sup>Includes all the samples used for phenotyping.

The *PGM1* zymogram was detected by the method of Spencer *et al.* (1964), applying a cellulose acetate foil (Shandon) absorbed with the staining solution on the surface of the gel; *PEPB* and *PEPD* activities were both detected according to Lewis and Harris (1967). Enzymatic detection of all other enzymes was carried out according to the methods described by Harris and Hopkinson (1976).

Allelic frequencies were estimated by direct gene counting since all polymorphisms were interpreted as being determined by codominant alleles. Deviations from expected Hardy-Weinberg phenotypic distributions were tested for each locus using the chi-square test. Phenotypic classes of fewer than five individuals were pooled. The BIOSYS-1 computer program (Swofford and Selander, 1989) was used to analyze the data.

## RESULTS AND DISCUSSION

The electrophoretic patterns of peptidase D (*PEPD*), phosphoglucomutase 1 (*PGMI*), and peptidase B (*PEPB*) were examined in 130–231 salamanders belonging to four populations of *Chioglossa lusitanica*. Although no progeny testing was performed to confirm the mode of inheritance of protein variants, zymograms generally conformed with simple patterns of codominant inheritance. Accordingly, the results indicated that the enzymatic systems examined are controlled by three structural loci. The electrophoretic bands corresponding to the alleles identified in each locus were numbered according to their discovery order.

Conventional starch gel electrophoresis did not reveal variation at the *PGMI* locus (results not shown). However, five gene products were detected using the isoelectric focusing technique. This fact might indicate the existence of small charge differences that are not distinguished by electrophoresis. Three allelic products, *PGMI\*1*, *PGMI\*2*, and *PGMI\*3*, were primarily distinguished (Fig. 2). Additionally, it was possible to identify a more anodal zone of *PGMI* which was tentatively interpreted as the result of a posttranslational modification of the protein. This secondary expression zone of the enzyme unveiled the existence of cryptic variation at alleles *PGMI\*1* and *PGMI\*3*. Therefore, the subtypes *PGMI\*1F*, *PGMI\*1S* and *PGMI\*3F*, *PGMI\*3S* were considered, while no different subtypes were detected for *PGMI\*2*. A total of 10 *PGMI* phenotypes was observed in 231 salamanders and interpreted as being defined by five codominant alleles at a single autosomal locus (Table II). The homozygotes show a two-banded pattern, while the heterozygous pattern is a juxtaposition of the bands seen in homozygous phenotypes, indicating a monomeric subunit structure for *PGMI* in *C. lusitanica*. Phosphoglucomutase has been reported to be one of the most variable proteins in vertebrate species (Ward *et al.*, (1992). In *C. lusitanica* *PGMI* seems to be the most polymorphic locus, and as in the human *PGMI* locus, the use of isoelectric focusing techniques enables the detection of additional variants (Harris and Hopkinson, 1976).

The electrophoretic patterns obtained for *PEPB* in 136 salamanders revealed four phenotypes (Fig. 3), which were interpreted as being determined by three codominant alleles, *PEPB\*1*, *PEPB\*2*, and *PEPB\*3*, at a single autosomal locus (Table II). The three-banded heterozygous pattern is indicative of a dimeric structure of *PEPB* in *C. lusitanica*. *PEPB* is also dimeric in frogs (Wright and Richards, 1982), fish (Frick, 1983), and birds (Matson, 1989) and monomeric in humans (Harris and Hopkinson, 1976).

Three *PEPD* phenotypes (Fig. 4) observed in 130 salamanders were interpreted as being controlled by three codominant alleles, *PEPD\*1*, *PEPD\*2*, and *PEPD\*3*, at a single autosomal locus. A single heterozygous individual with a three-banded pattern was detected at this locus, pointing to a dimeric structure of

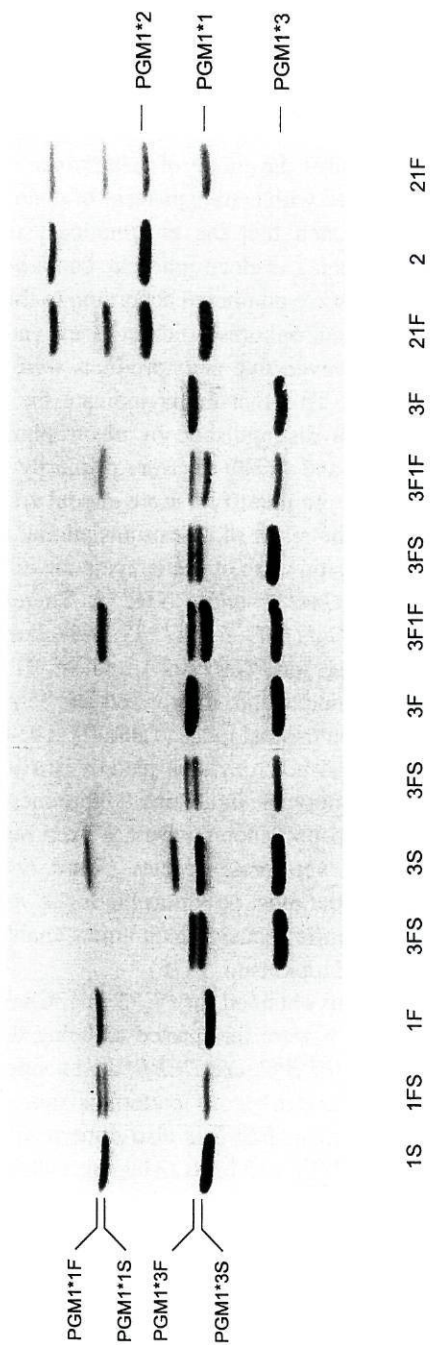


Fig. 2. Electrophoretic patterns of *PGM1* after isoelectric focusing.

## Genetic Variation in the Golden-Striped Salamander

377

Table II. Observed and Expected (in Parentheses) Phenotypic Distributions of *PGMI*, *PEPB*, and *PEPD* Loci in Four Populations of *Chioglossa lusitanica*<sup>a</sup>

Locus	Phenotype	Population			
		Gerês	Sta Justa	Montemuro	Lousã
<i>PGMI</i>	1F	19 (19.2)	17 (19.7)	2 (2.9) <sup>2</sup>	0 (0.2)
	1FS	16 (15.6)	51 (46.2)	4 (2.3) <sup>2</sup>	—
	1S	3 (3.2)	25 (27.1)	0 (0.4) <sup>2</sup>	—
	2	—	—	14 (13.8)	—
	21F	—	—	13 (12.6) <sup>1</sup>	—
	21S	—	—	4 (5.0) <sup>1</sup>	—
	3F	—	—	—	50 (49.9)
	3FS	—	—	—	6 (6.7)
	3S	—	—	—	1 (0.2)
	3F1F	—	—	—	6 (5.6)
	3F1S	—	—	—	—
	3S1F	—	—	—	0 (0.4)
	3S1S	—	—	—	—
	<i>n</i>		38	93	37
$\chi^2$ ( <i>P</i> , df)		—	1.024 (0.311, 1)	0.048 (0.827, 1)	—
<i>PEPB</i>	1	35	29 (28.3)	1 (1.6)	44 (44.2)
	21	—	2 (3.6)	10 (8.8)	—
	2	—	1 (0.1)	12 (12.6)	—
	31	—	—	—	2 (1.8)
	32	—	—	—	—
	3	—	—	—	0 (0.0)
<i>n</i>		35	32	23	46
<i>PEPD</i>	1	33 (33.3)	22	25	—
	21	—	—	—	—
	2	—	—	—	49
	31	1 (0.7)	—	—	—
	32	—	—	—	—
	3	0 (0.0)	—	—	—
		34	22	25	49

<sup>a</sup>*n*, sample size; df, degrees of freedom. Superscripts 1 and 2, phenotypic classes pooled for H.W.

*PEPD* in *C. lusitanica*, as observed in other vertebrates (Harris and Hopkinson, 1976; Wright and Richards, 1982; Matson, 1989).

The observed phenotypic distributions in the three loci studied (*PGMI*, *PEPB*, and *PEPD*) showed a good agreement with the expected distributions under the assumption of Hardy–Weinberg equilibrium (Table II).

A highly differentiated allelic distribution across the studied populations is clearly indicated by the results in Table III. The *PGMI* gene frequencies were quite different in the four populations. *PGMI*\*1F is observed in all populations, with a frequency decreasing consistently from Gerês (0.71) to Lousã (0.05). *PGMI*\*1S is detected in Gerês, Sta Justa, and Montemuro but not in Lousã. Private alleles were detected at moderate to high frequencies in Montemuro (*PGMI*\*2) and Lousã (*PGMI*\*3F and *PGMI*\*3S).

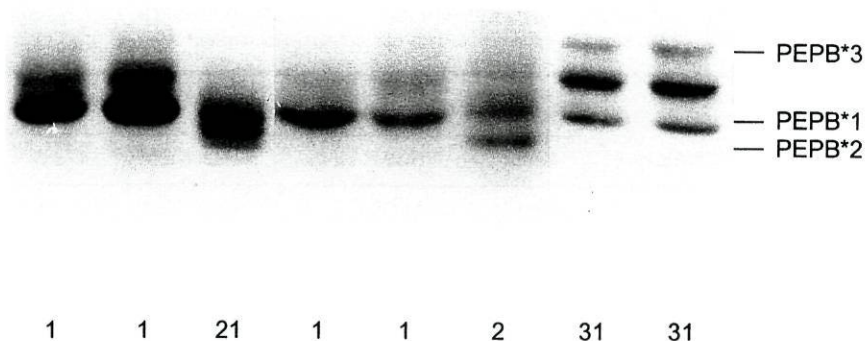


Fig. 3. Electrophoretic patterns of *PEPB* after isoelectric focusing.

The *PEPB\*1* allele is common to all the populations, while *PEPB\*2* appears only in Sta Justa and Montemuro. *PEPB\*3* was detected only in the population from Lousã, at a low frequency.

At the *PEPD* locus a tendency for allele fixation is observed. *PEPD\*1* is fixed in the populations from Sta Justa and Montemuro, while *PEPD\*2* is fixed in the population from Lousã. *PEPD* can, therefore, be considered as a diagnostic locus, separating the Lousã population from the others (i.e., Montemuro, Sta Justa, and Gerês). In the population of Gerês a rare allele, *PEPD\*3*, was detected at a low frequency.

Values of the average observed heterozygosity ( $H_{obs}$ ) are not largely different from the expected heterozygosity values ( $H_{exp}$ ) and reach their maximum observed value in the population from Montemuro (4.8%), intermediate values in the populations from Gerês and Sta Justa (2.1 and 2.9%, respectively), and a low value in the population from Lousã (1.1%). The average subpopulation heterozygosity rate (0.027) is markedly lower than the average values found by Nevo and Beiles (1991) and Ward *et al.* (1992) in the amphibians (0.073 and 0.094, respectively), urodeles (0.070), and salamandrids (0.058). This study did not demonstrate a geographical pattern of genetic diversity in the populations of *C. lusitanica*. However, the southernmost population (Lousã), located near the probable limit for the Iberian distribution of *C. lusitanica*, presents low values of heterozygosity (0.012) caused by a tendency for allele fixation in two of three polymorphic loci. This lower level of genetic diversity could be explained by the more marginal location of this population along with the greater influence of genetic drift and bottlenecks in populations at the border of a species distribution. On the other hand, heterozygosity shows maximum values in the population from Montemuro (0.047), located in a more central area of the species distribution, and approaches the heterozygosity rate typical for the salamandrids (0.058).

The results can be considered indicative of a high degree of population differentiation in *C. lusitanica*. However, more data are needed to determine

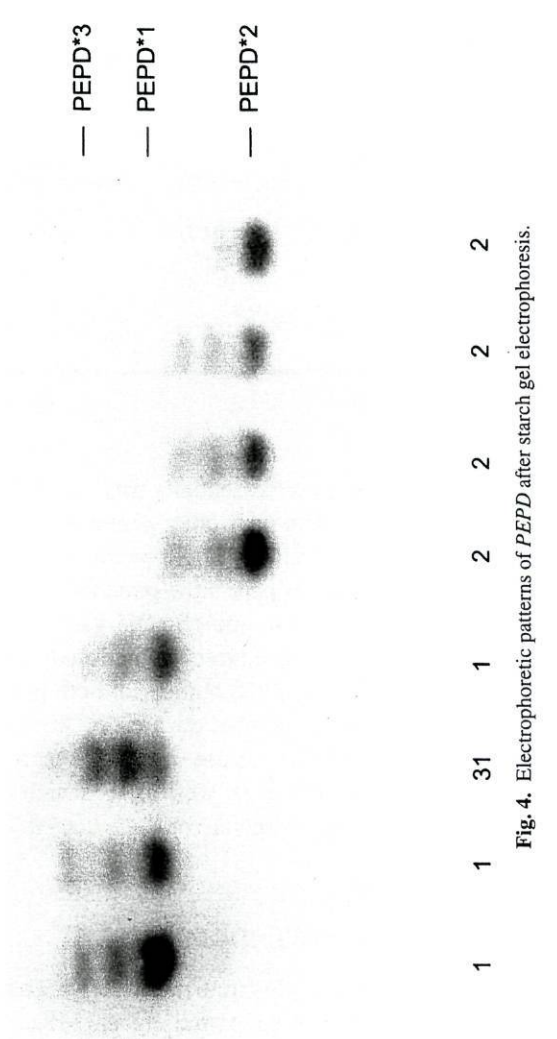


Fig. 4. Electrophoretic patterns of PEPD after starch gel electrophoresis.

**Table III.** Allele Frequencies (Standard Errors in Parentheses) of Three Polymorphic Loci in Four Populations of *Chioglossa lusitanica*; Observed ( $H_o$ ) and Expected ( $H_e$ ) Heterozygosities Also Reported

Locus	Allele	Gerês	Sta Justa	Montemuro	Lousã
<i>PGMI</i>	<i>1F</i>	0.71 ( $\pm 0.05$ )	0.46 ( $\pm 0.04$ )	0.28 ( $\pm 0.05$ )	0.05 ( $\pm 0.02$ )
	<i>1S</i>	0.29 ( $\pm 0.05$ )	0.54 ( $\pm 0.04$ )	0.11 ( $\pm 0.04$ )	—
	<i>2</i>	—	—	0.61 ( $\pm 0.06$ )	—
	<i>3F</i>	—	—	—	0.89 ( $\pm 0.03$ )
	<i>3S</i>	—	—	—	0.06 ( $\pm 0.02$ )
<i>PEPB</i>	<i>1</i>	1.00 ( $\pm 0.00$ )	0.94 ( $\pm 0.03$ )	0.26 ( $\pm 0.07$ )	0.98 ( $\pm 0.02$ )
	<i>2</i>	—	0.06 ( $\pm 0.03$ )	0.74 ( $\pm 0.07$ )	—
	<i>3</i>	—	—	—	0.02 ( $\pm 0.02$ )
<i>PEPD</i>	<i>1</i>	0.99 ( $\pm 0.02$ )	1.00 ( $\pm 0.00$ )	1.00 ( $\pm 0.00$ )	—
	<i>2</i>	—	—	—	1.00 ( $\pm 0.00$ )
	<i>3</i>	0.01 ( $\pm 0.02$ )	—	—	—
$H_o^a$		0.021	0.029	0.048	0.011
$H_e^a$		0.021	0.029	0.044	0.011

<sup>a</sup>Including monomorphic loci.

whether the population structure is built essentially between river basins based on the low vagility of these salamanders or if other phenomena are involved. In a species with strong ecological constraints it might be important to investigate the ecogeographical meaning of eventual gene flow patterns looking for a relation between some important physiographic and climatic variables and the present population genetic structure. Therefore, a more detailed study is now in progress, comprising a considerable extension of the number of both genetic markers and sampled populations in the whole distribution area of the species, including Spain. Furthermore, it is expected that the use of mtDNA markers will improve the ability to detect genetic variability as well as to search for an historical perspective on the population genetic structure of *C. lusitanica*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the ICN (Instituto da Conservação da Natureza) and LIFE Program. J. Alexandrino was supported by an MSc. Grant (PRAXIS XXI/BM/2045/94) from JNICT (Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica). We are grateful to P. Alexandrino and M. Branco for technical help and discussions and also to V. Lima, F. Sequeira, J. Teixeira, C. Cardoso, B. Fráguas, H. Gonçalves, C. Menezes, and C. Oliveira for their kind help in collecting the samples.

## REFERENCES

- Amorim, A., and Siebert, G. (1982). Glutamate pyruvate transaminase, esterase D, glyoxalase I, and phosphoglucomutase 1 polymorphisms in Porto district (Portugal). *Hum. Hered.* **32**:298.
- Arntzen, J. W. (1981). Ecological observations on *Chioglossa lusitanica* (Caudata, Salamandridae). *Amphibia-Reptilia* **1**:187.
- Arntzen, J. W. (1994a). Allometry and autotomy of the tail in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*. *Amphibia-Reptilia* **15**:267.
- Arntzen, J. W. (1994b). Speedy salamanders: Sedentariness and migrations of *Chioglossa lusitanica*. *Rev. Esp. Herp.* **8**:81.
- Arntzen, J. W. (1995). Temporal and spatial distribution of the golden-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*) along two mountain brooks in northern Portugal. *Herpetol. J.* **5**:213.
- Ferrand, N. (1995). *Varição genética de proteínas em populações de coelho (Oryctolagus cuniculus). Análise da diferenciação subespecífica, subestruturação, expansão geográfica e domesticação*. Doctoral thesis, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- Ferrand, N., and Amorim, A. (1990). Genetic polymorphism of  $\delta$ -aminolaevulinic acid dehydratase (E.C. 4.2.1.24, ALAD) in the domestic rabbit. *Anim. Genet.* **21**:217.
- Frick, L. (1983). An electrophoretic investigation of the cytosolic di- and tripeptidases of fish: Molecular weights, substrate specificities, and tissue and phylogenetic distributions. *Biochem. Genet.* **21**:309.
- Goux, L. (1957). Contribution a l'étude écologique, biologique et biogéographique de *Chioglossa lusitanica* Barb. (Urodela, Salamandridae). *Bull. Soc. Zool. Fr.* **82**:361.
- Harris, H., and Hopkinson, D. A. (1976). *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*, North-Holland, Amsterdam.
- Lewis, W. H. P., and Harris, H. (1967). Human red cell peptidases. *Nature* **215**:351.
- Matson, R. H. (1989). Avian peptidase isozymes: Tissue distributions, substrate affinities, and assignment of homology. *Biochem. Genet.* **27**:137.
- Nevo, E., and Beiles, A. (1991). Genetic diversity and ecological heterogeneity in amphibian evolution. *Copeia* **1991**:565.
- Povey, S., Corney, G., Lewis, W. H. P., Robson, E. B., Parrington, J. M., and Harris, H. (1972). The genetics of peptidase C in man. *Ann. Hum. Genet.* **35**:455.
- Spencer N., Hopkinson, D. A., and Harris, H. (1964). Phosphoglucomutase polymorphism in man. *Nature* **204**:742.
- Swofford, D. L., and Selander, R. K. (1989). *BIOSYS-1: A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Population Genetics and Biochemical Systematics*, Release 1.7, Illinois Natural History Survey, Champaign.
- Titus, T. A., and Larson, A. (1995). A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary radiation of the salamander family Salamandridae. *Syst. Biol.* **44**(2):125.
- Vences, M. (1990). Untersuchungen zur Ökologie, Ethologie und geographischen Variation von *Chioglossa lusitanica* BOCAGE, 1864. *Salamandra* **26**:267.
- Ward, R. D., Skibinski, D. O. F., and Woodward, M. (1992). Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evol. Biol.* **26**:73.
- Wright, D. A., and Richards, C. M. (1982). Peptidase isozymes of the leopard frog *Rana pipiens*: Properties and genetics. *J. Exp. Zool.* **221**:283.

## Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela)

J. ALEXANDRINO,\*† E. FROUFE,† J. W. ARNTZEN\*† and N. FERRAND\*†

\*Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Praça Gomes Teixeira, 4050 Porto, Portugal, †Centro de Estudos de Ciência Animal, ICETA, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte, Crasto, Vairão, 4480 Vila do Conde, Portugal

### Abstract

The golden-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*) is an ecologically specialized species, endemic to north-western Iberia. Patterns of genetic variation were assessed at seven polymorphic enzyme loci and one mitochondrial DNA (mtDNA) marker (cytochrome *b*) in 17 populations across its range. Estimates of enzyme genetic diversity revealed a high degree of genetic subdivision ( $F_{ST} = 0.68$ ), mainly attributable to the existence of two groups of populations. The groups were located, respectively, north and south of the Mondego River, indicating that this river coincided with a major historical barrier to gene flow. A significant decrease in genetic variability from the Mondego northwards was associated with the Douro and Minho rivers. mtDNA sequence variation revealed a congruent pattern of two haplotype groups ( $d = 2.2\%$ ), with a geographical distribution resembling that of allozymes. The pattern and depth of genetic variation is consistent with the following hypotheses: (i) subdivision of an ancestral range of the species prior to the middle Pleistocene; (ii) secondary contact between populations representing historical refugia; (iii) relatively recent range expansion giving rise to the northern part of the species range; and (iv) loss of genetic variation through founder effects during range expansion across major rivers.

**Keywords:** allozymes, Amphibia, *Chioglossa lusitanica*, genetic subdivision, glacial refugia, golden-striped salamander, mtDNA, postglacial range expansion

Received 23 October 1999; revision received 15 January 2000; accepted 15 January 2000

### Introduction

Most organisms are distributed in a more or less spatially structured array of populations. This structure depends on the interaction between the ecological requirements of the species, its inherent ability for dispersal, and habitat availability. However, the genetic structure of populations is not only determined by current population dynamics, but also by historical patterns of gene flow, thus raising difficulties in separating the two factors. The smaller the influence of current population dynamics on the pattern of genetic variation the easier it will be to assess the history of populations and use

it, along with information on past geological and climatic events, to reconstruct the historical biogeography of a species.

Salamanders are organisms with low mobility and strict ecological requirements, often subdivided into genetically isolated populations and, therefore, potentially suitable for studies of historical biogeography (Slatkin 1981; Larson *et al.* 1984). Indeed, recent work on *Ambystoma* salamanders confirmed the importance of historical events in shaping the present-day distribution of genetic variation (Phillips 1994; Templeton *et al.* 1995). The golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* Bocage 1864, is a peculiar streamside species with a distribution restricted to north-western Iberia. These salamanders are generally found in forested, low elevation mountainous areas, with high precipitation and mild winters, and exhibit a suite of morphophysiological traits that determine a strong dependence on brook vicinities and other moist habitats. This may

Correspondence: João Alexandrino. Present address: †Centro de Estudos em Ciência Animal, ICETA, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte, Crasto, Vairão, 4480 Vila do Conde, Portugal. Fax: +351252 661780, E-mail: jmalexan@mail.icav.up.pt

772 J. ALEXANDRINO ET AL.

result in a highly directional dispersal ability with gene flow occurring parallel rather than perpendicular to watercourses, through adults and juveniles following moist brook embankments and through larval drift (Arntzen 1981, 1994). In spite of the ecological constraints, the dense network of mountain streams in north-western Iberia renders its distribution continuous if considered on a 10-km square grid scale (Sequeira *et al.* 1996). However, large streams and rivers do not constitute a regular habitat for *C. lusitanica* and could form barriers to gene flow roughly proportional to their size.

Our aims are to investigate patterns of genetic variation in *C. lusitanica* in order to reconstruct its historical biogeography and to evaluate implications for conservation. Preliminary work covering four populations and 21 allozyme loci revealed a high level of genetic substructuring (Alexandrino *et al.* 1997). Here we document the spatial distribution of allozyme and mtDNA variation in populations across the whole range of *C. lusitanica*, to examine the predictions that: (i) rivers are instrumental in shaping genetic structure in this species; and (ii) patterns of genetic diversity reflect the history of populations. We found evidence supportive of those predictions, allowing us to develop hypotheses that may explain the historical biogeography of the golden-striped salamander, notwithstanding a certain lack of knowledge concerning the north-western Iberian palaeoecology.

### Materials and methods

Salamanders were collected from 17 localities across north-western Iberia covering the species range (Fig. 1). Sample size was between 12 and 107. The tail end of each salamander was removed mimicking natural autotomy and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ . A tissue extract was obtained by grinding tail tissue in distilled water (1:3 w/v). The homogenate was centrifuged at 15 000 g for 7 min at  $0^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was decanted and applied to either starch gels for electrophoresis (SGE) or to polyacrylamide gels for isoelectric focusing (IEF). Peptidase A (PEP-A), peptidase C (PEP-C), phosphogluconate dehydrogenase (PGD), alcohol dehydrogenase (ADH) and enzymes previously shown to be polymorphic (phosphoglucomutase 1, PGM-1; peptidase B, PEP-B; and peptidase D, PEP-D; Alexandrino *et al.* 1997) were scored for all populations. Alleles of ADH were resolved by isoelectric focusing a pH gradient established by the 1:1:3 mixture 5–6, 5–8 and 3.5–10 pharmalytes (Pharmacia) at a final concentration of 6% (v/v). Phosphoric acid 0.25 M and sodium hydroxide 1 M were used as anodal and cathodal electrode solutions, respectively. Gels were prefocused for 1 h. An 8- $\mu\text{L}$  sample of tissue extract was applied to the gel using a silicone strip (Serva) placed at 15 mm from the cathode. Focusing was then performed for 3 h. Enzymatic detection of ADH

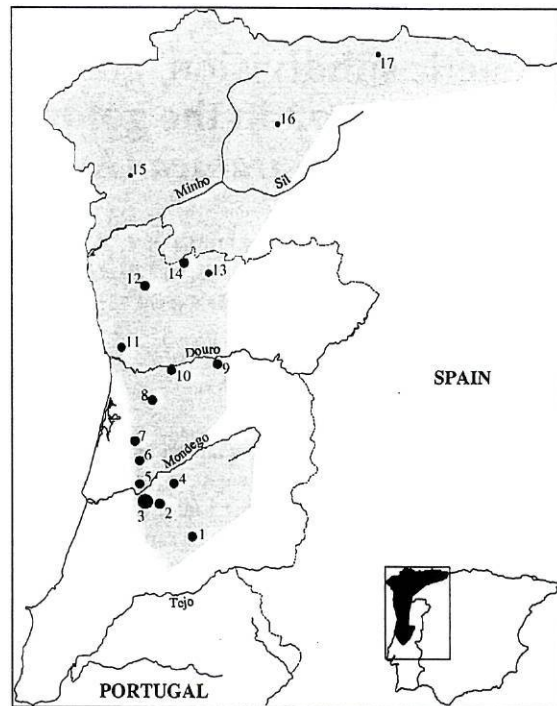


Fig. 1 The distribution of *Chioglossa lusitanica* in the north-western Iberian Peninsula (shaded areas, from Arntzen 1999) and the study localities: 1, Muradal, Foz de Giraldo (MU); 2, Lousã, C. Pêra (LCP); 3, Lousã, Vilarinho (LVI); 4, Açor, Margaraça (AC); 5, Várzeas (VA); 6, Buçaco (BU); 7, Saide (SA); 8, Covelo (C); 9, Tarouca (T); 10, Montemuro (M); 11, Valongo (V); 12, Bom Jesus (B); 13, Barroso (BA); 14, Gerês (G); 15, Pontevedra (PO); 16, Fonsagrada (FS); 17, Salas (SAL). Dots representing localities are sized proportionally to the level of expected heterozygosity.

was carried out following Harris & Hopkinson (1976). Protocols for the other enzymes were those of Alexandrino *et al.* (1997).

Allelic frequencies were determined by direct gene counting. Private alleles were defined as those observed in a single population. The Genetic Data Analysis computer program (Lewis & Zaykin 1999) was used: (i) to calculate the average number of alleles ( $A$ ) and average expected heterozygosity ( $H_E$ ); (ii) to assess deviations from hypothesized Hardy-Weinberg equilibrium (by exact probability following Fisher's method in a Markov-chain procedure); and (iii) to estimate Wright's  $F$ -statistics  $F$ ,  $\theta$  and  $f$  (estimators of  $F_T$ ,  $F_{ST}$  and  $F_{IS}$ , respectively) according to Weir & Cockerham (1984), with associated bootstrap estimates for determination of the 95% confidence interval (CI). Hierarchical cluster analysis of populations (UPGMA) was carried out using PHYLIP version 3.5 (Felsenstein 1993) with Cavalli-Sforza & Edwards (1967) chord genetic distances. Bootstrap replication values

were determined to assess the strength of support from the data to the UPGMA-dendrogram. Non-hierarchical cluster analysis was carried out by multidimensional scaling (Lessa 1990) with the genetic distances using STATISTICA (StatSoft 1993).

DNA was extracted from alcohol-preserved tissue following the protocol of Sambrook *et al.* (1989). An 840-bp fragment of the Cyt *b* mtDNA gene was amplified via polymerase chain reaction (PCR) using the primers MVZ15 (Moritz *et al.* 1992; Tan & Wake 1995) and cytb702 (5'-GGCAAATAGGAAGTATCATTCTG-3' Moritz *et al.* 1992, modified). Samples were amplified through 35 cycles of denaturing for 90 s at 92 °C, annealing for 60 s at 54 °C and extending for 90 s at 72 °C. Sequences were determined by automated sequencing in the ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems) following the ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing protocols. Sequences of 329 bp, corresponding to 16 309 (5' end) and 16 637 (3' end) of the *Xenopus laevis* mtDNA (Roe *et al.* 1985) were obtained for 44 individuals (two to four specimens per population).

A phylogenetic analysis of mtDNA haplotypes with published sequence data for *Mertensiella caucasica* (Tarkhishvili *et al.* 2000) and *Salamandra salamandra* (García-París *et al.* 1998) as outgroups, was carried out with PAUP version 3.1 (Swofford 1993). A heuristic search with equal weighting for different character types (i.e. codon positions or transition/transversions) yielded a single tree and, because no homoplasy was observed within the ingroup, a single maximum parsimony network. Hierarchical cluster analysis of haplotypes (UPGMA) was carried out with Kimura two-parameter estimates of sequence divergence.

The significance of association between genetic variation and ecological and geographical distances was tested by partial Mantel tests (R version 2.0; Manly 1996). Pairwise genetic distance, heterozygosity difference (absolute pairwise difference between  $H_E$  values for populations) and allelic difference (absolute pairwise difference between  $A$  values for populations), for allozymes, and average haplotype sequence divergence (between haplotypes for each pair of populations), for mtDNA data, were used as dependent variables. Geographic distance was measured on 1:100 000 maps. Ecological distance was defined as the number of major rivers separating pairs of populations. The major rivers considered were those completely crossing the species range, i.e. Mondego, Douro and Minho/Sil (Fig. 1).

## Results

### Allozyme variation

*Allozyme polymorphisms.* Genetic polymorphisms were

newly described in four enzyme systems: ADH, PEP-A, PEP-C and PGD. Zymograms showed separate zones of activity for all enzymes. Polymorphisms were interpreted as determined by codominant alleles and the enzymatic systems examined as controlled by four structural loci. Two alleles were observed at *Pep-A*, three at *Pep-C* and *PGD*, and four at *ADH*. Four alleles (*PGM-1\*1FV*, *PGM-1\*1SV*, *PGM-1\*5* and *PEP-B\*4*) were newly described at loci known to be polymorphic (Alexandrino *et al.* 1997), bringing the total at 28 alleles over seven loci. Statistically significant deviations from expected phenotypic distributions assuming the Hardy-Weinberg equilibrium were not observed. Enzyme phenotypes corresponded to expectations based on their reported quaternary structure in amphibians and other vertebrates (Harris & Hopkinson 1976; Wright & Richards 1982; Frick 1983; Matson 1989). Allele frequencies and measures of genetic variability are given in Table 1.

*Allelic distribution and heterozygosity.* Substantial differences in the allelic distributions were observed between populations south and north of the Mondego River, to which five loci contributed (*ADH*, *PEP-C*, *PEP-D*, *PGD*, *PGM-1*). The loci *ADH* and *PEP-D* had alleles at high frequency in southern populations that were not observed in northern populations (*PEP-D\*2* and *ADH\*2*). The other three loci showed a similar but less differentiated pattern, with either alleles typical for southern populations present at low frequency in northern populations (*PGM-1\*3F* in populations 5 and 6, and *PEP-C\*2* in population 12), or with an allele at low frequency restricted to (*PGD\*2*) or shared with (*PGM-1\*1F*) southern populations. Yet other alleles were found south of the Mondego only, at low frequency (*PEP-B\*4* and *PGM-1\*3S*).

Populations located between the Mondego and the Douro (populations 5–10) were characterized by possession at moderate to high frequency (0.28–0.82) of the *PEP-B\*2* allele, that was otherwise only detected in population 11 at low frequency. Populations 9 and 10, adjacent to the Douro, are further characterized by a high frequency of the allele *PGM-1\*2*. Portuguese populations located north of the river Douro and all Spanish populations showed little genetic variation (average  $H_E$  0.050 and 0.004, respectively), with up to nine alleles over seven loci. Eleven private alleles were detected and nine of these were found in populations from between Douro and Mondego. One low frequency allele was shared between two populations north and south of the Mondego (Table 1). Expected heterozygosity ranged from low values for populations at the northern and southern ends of the species range to a maximum of 0.27 at locality 3 in the Lousã mountains (Table 1, Fig. 1). A significantly negative relationship was observed between  $H_E$  and distance along a south-north axis ( $r^2 = 0.82$ ,  $P < 0.05$ ), in

774 J. ALEXANDRINO ET AL.

**Table 1** Allele frequency, sample size (*N*), average number of alleles (*A*) and average expected heterozygosity (*H<sub>E</sub>*) at seven polymorphic loci in 17 populations of *Chioglossa lusitanica*

Locus	Allele	Populations																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ADH	N	28	36	31	33	25	47	29	26	17	21	24	14	17	23	18	12	25
	1	—	0.46	0.34	—	1.00	0.99	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	2	1.00	0.54	0.66	1.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PEPA	N	28	26	28	21	24	26	20	21	17	21	23	14	17	21	17	12	26
	1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	2	—	—	—	—	—	0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PEPB	N	26	79	31	33	21	48	33	48	17	44	45	14	17	30	18	12	26
	1	1.00	0.99	0.98	1.00	0.55	0.51	0.76	0.55	0.18	0.23	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	2	—	—	—	—	0.43	0.49	0.24	0.45	0.82	0.77	0.05	—	—	—	—	—	—
	3	—	0.01	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PEPC	N	28	25	20	13	17	17	18	21	15	21	22	11	16	20	18	12	22
	1	—	0.12	0.33	—	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.73	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	2	1.00	0.88	0.67	1.00	—	—	—	—	—	—	—	0.27	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PEPD	N	28	83	34	31	27	47	39	21	17	44	45	14	17	26	17	12	26
	1	0.02	0.01	0.32	0.07	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	2	0.98	0.99	0.68	0.93	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PGD	N	16	26	23	21	24	29	20	27	17	21	23	13	17	18	18	12	15
	1	0.87	0.94	0.93	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	2	0.13	0.06	0.07	0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—
PGMI	N	27	83	44	33	25	47	34	48	17	58	107	14	16	33	18	12	26
	1F	—	0.02	0.09	—	0.82	0.84	0.77	0.45	0.44	0.28	0.46	0.36	0.34	0.63	1.00	0.96	1.00
	1S	—	—	—	—	—	0.12	0.22	0.53	—	0.09	0.54	0.64	0.66	0.37	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.56	0.63	—	—	—	—	—	—	—
	3F	1.00	0.94	0.73	1.00	0.18	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3S	—	0.04	0.18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3V	—	—	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1FV	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1SV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	—
	5	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A		1.29	2.00	2.00	1.29	1.57	2.00	1.43	1.71	1.29	1.57	1.29	1.29	1.14	1.14	1.00	1.14	1.00
H <sub>E</sub>		0.041	0.140	0.273	0.042	0.124	0.143	0.105	0.149	0.112	0.131	0.083	0.122	0.065	0.066	0.000	0.011	0.000

the group of populations north of the Mondego (Fig. 2). A similar result was obtained for *A* and geographical distance ( $r^2 = 0.64$ ,  $P < 0.05$ ).

*Genetic differentiation.* *F*-statistics were estimated at *F* ( $F_{IT}$ ) =  $0.679 \pm 0.097$  (CI = 0.538–0.848)  $\theta(F_{ST})$  =  $0.678 \pm 0.088$  (CI = 0.533–0.845) and *f* ( $F_{IS}$ ) =  $-0.005 \pm 0.048$  (CI = -0.051–0.210). These values were significantly different from zero except for the latter one. All loci revealed a high contribution to the overall  $\theta$  with the exception

of the less polymorphic *PEP-A* and *PGD* (results not shown).

Multidimensional scaling of genetic distances resolved 17 populations of *Chioglossa lusitanica* in a coordinate system of which we present the first and second dimension (Fig. 3). Visual inspection of the bivariate plot revealed two clusters consisting of populations 1–4 (group 1) and populations 5–17 (group 2). The latter group can arbitrarily be subdivided in three subgroups. Hierarchical clustering in a UPGMA-dendrogram produced the same two

GENETIC SUBDIVISION IN A SALAMANDER 775

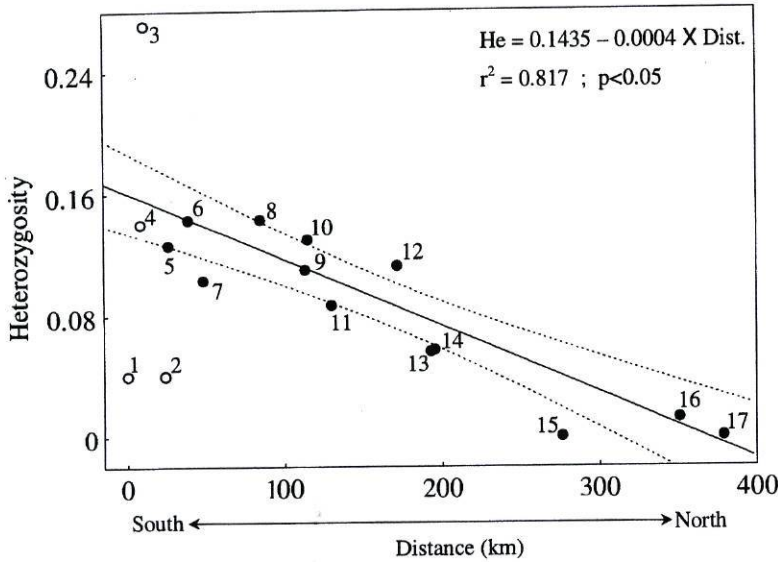


Fig. 2 Regression of expected enzyme heterozygosity of group 2 populations of *Chioglossa lusitanica* against the distance from the southernmost locality (locality 1) along a South-North axis. The interrupted lines represent the bounds of the 95% confidence limits of the regression line. Group 1 populations (open symbols) are included for comparison.

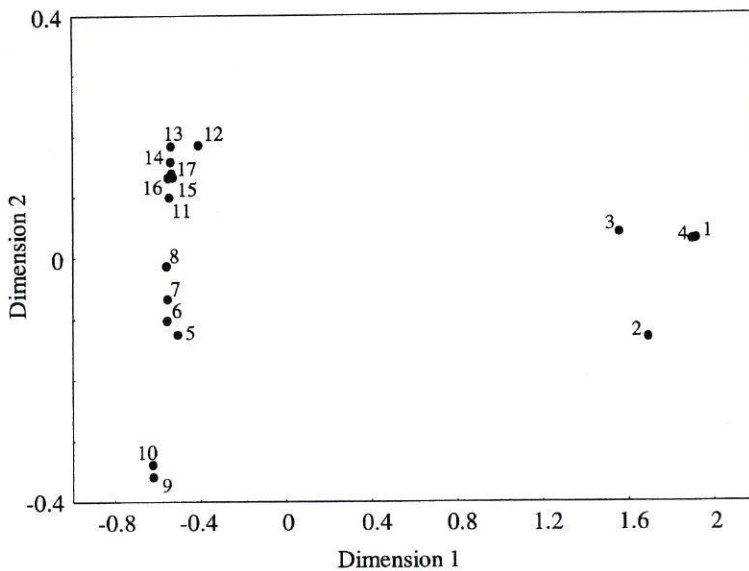


Fig. 3 Scatterplot of scores along the first and second dimensions obtained by multidimensional scaling of enzyme genetic distances for 17 populations of *Chioglossa lusitanica* (see text for details). Note that the axes have different scales.

major groups, the separate status of which was strongly supported by the bootstrap analysis (Fig. 4). Within group 2 populations four UPGMA-clusters were found with varying levels of bootstrap support (55–100%). On basis of the combined data (Figs 1, 3 and 4) we distinguish the following groups for practical purposes: group 2a (populations 5–8); group 2b (populations 9 and 10); and group 2c (populations 11–17). Together groups 2a and 2b comprise the study populations located between the Mondego and the Douro, and group 2c comprises the populations north of the Douro.

Previously published data for populations 2, 10, 11 and 14 (Alexandrino *et al.* 1997) were taken into account to calculate Nei's (1978) genetic distance over 22 loci. The genetic distance between group 1 (represented by population 2) and group 2 (represented by populations 10, 11 and 14) averaged at  $0.154 \pm 0.023$ .

*mtDNA variation*

Fifteen variable positions defined 13 distinct haplotypes with sequence divergence ranging from 0.3% to 3.2% and

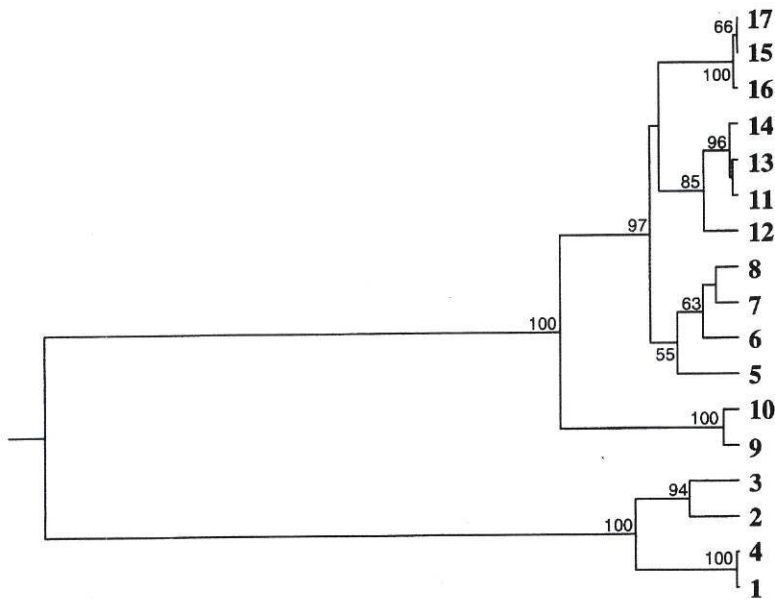


Fig. 4 A UPGMA dendrogram based on Cavalli-Sforza & Edwards (1967) chord enzyme genetic distances for 17 populations of *Chioglossa lusitanica*, with percent bootstrap replication scores > 50 indicated.

**Table 2** Variable positions in the 329 bp segment of the cytochrome *b* gene defining 13 different haplotypes and their distribution across 17 populations of *Chioglossa lusitanica*. Nucleotide positions in boldface indicate aminoacid replacement substitutions. Species included for outgroup comparison are *Salamandra salamandra* (*Ssc*, *Ssm*) and *Mertensiella caucasica* (*McA*, *McB1*)

Haplotypes	Nucleotide position													Populations																					
	3	4	2	4	2	5	3	3	2	5	2	7	6	4	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			
<i>h1</i>	t	t	a	t	g	t	t	a	t	t	a	a	a	c	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
<i>h2</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
<i>h3</i>	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	3	2	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
<i>h4</i>	c	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
<i>h5</i>	.	.	.	.	.	.	g	.	c	.	.	.	.	.	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>h6</i>	.	.	.	.	.	c	g	.	c	.	.	.	.	.	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>h7</i>	.	.	.	.	.	.	g	.	c	.	.	t	.	.	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>h8</i>	.	.	.	c	.	.	g	.	c	.	.	.	.	.	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>h9</i>	.	c	g	c	.	.	g	c	c	.	.	.	.	.	—	—	—	—	1	—	2	—	1	1	2	2	4	2	2	2	2	2	2		
<i>h10</i>	.	c	g	c	.	.	g	c	c	.	g	.	.	.	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>h11</i>	.	c	g	c	.	c	g	c	c	.	g	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>h12</i>	.	c	g	c	.	.	g	c	c	.	g	g	.	.	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>h13</i>	.	c	g	c	.	.	g	c	c	c	g	g	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Ssc</i>	c	a	.	a	c	.	a	g	c	.	c	.	.	.																					
<i>Ssm</i>	c	a	.	a	.	a	g	c	.	.	.	.	.	.																					
<i>McA</i>	c	a	.	a	.	c	c	.	.	.	c	.	t	t																					
<i>McB1</i>	c	a	.	a	.	c	c	.	.	.	g	.	g	.																					

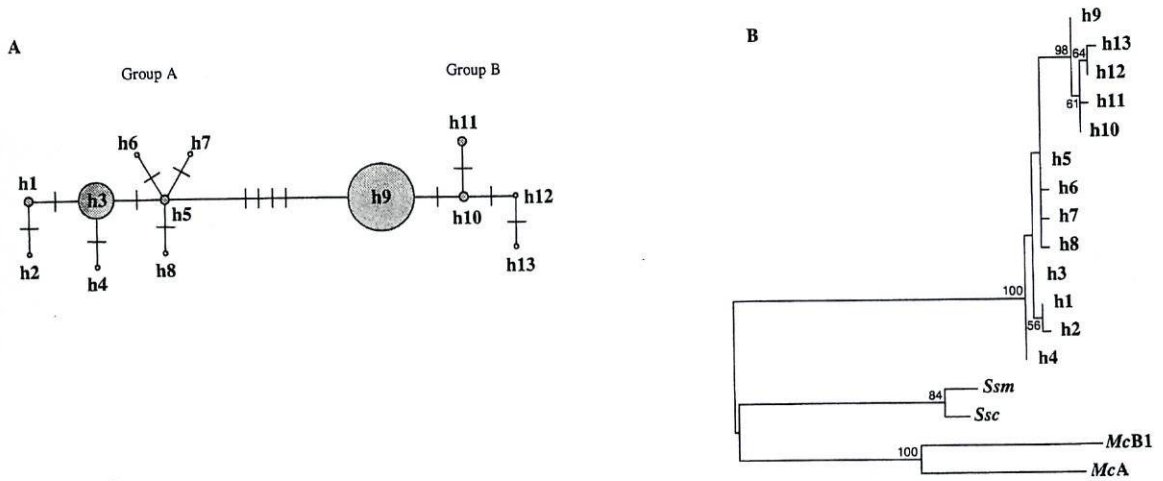
an overall nucleotide diversity of 1.4%. Two nucleotide substitutions were observed at the first codon position, one at the second position, and 12 at the third position, underlying two aminoacid replacements (Table 2).

Two sets of haplotypes were evident from the maximum parsimony network (Fig. 5A) and an UPGMA-dendrogram (results not shown). Haplotypes h1–h8 (group A) and

haplotypes h9–h13 (group B) differed by a minimum of four nucleotide substitutions and 2.2% average sequence divergence (*d*). Within group A and group B, haplotypes were separated by single substitutions.

The phylogenetic analysis revealed a single most parsimonious tree with a total length of 147. Two monophyletic groups were found at the level of the root, one consisting

GENETIC SUBDIVISION IN A SALAMANDER 777



**Fig. 5** (A) Maximum parsimony network of cytochrome *b* haplotypes observed in *Chioglossa lusitanica*. Circle size is proportional to the observed haplotype frequencies. (B) Single most parsimonious tree for 13 mtDNA *cytb* haplotypes from *Chioglossa lusitanica* and four outgroup haplotypes from *Salamandra salamandra* (*Ssc*, *Ssm*) and *Mertensiella caucasica* (*McA*, *McB1*). Percent bootstrap replication scores > 50 are indicated on each branch.

**Table 3** Partial Mantel test for association between genetic differentiation and geographical and ecological (river) distance in *Chioglossa lusitanica*. In the right hand panel ecological distance is partitioned over the three rivers constituting hypothesized barriers to gene flow. Tests are carried out over 17 populations (upper panel) and over 'group 2' populations (lower panel).

Genetic differentiation (dependent variable)	Causal hypothesis (independent variables)			Ecological distance		
	Geographical distance	Ecological distance	Geographical distance	Ecological distance		
				Mondego	Douro	Minho
<i>17 populations</i>						
Enzyme genetic distance	ns	***	ns	***	ns	ns
mtDNA distance	ns	**	**	**	ns	ns
<i>Group 2</i>						
Enzyme genetic distance	ns	*	ns	na	**	ns
Heterozygosity difference	*	***	ns	na	**	**
Allelic difference	ns	*	ns	na	**	ns
mtDNA distance	ns	ns	ns	na	ns	ns

na – not applicable, ns – not significant, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

of haplotype h4, and the other consisting of the remaining 12 haplotypes. Group B was defined by three synapomorphic character states (haplotypes h9–h13), with a high (98%) bootstrap replication score. No unambiguous support (< 56%) was found for the placement of the root, as long as group B remained monophyletic (Fig. 5B).

The geographical distribution of haplotypes was distinctly nonrandom. Haplotype h1 was observed in populations 3 and 5, haplotypes h2–h8 were observed in populations 1–5 and haplotypes h9–h13 were observed in populations 7–17. Only population 6 possessed haplotypes of the B as well as the non-B group (haplotypes h9 and h10 and haplotype 3, respectively; Table 2). The most frequently observed

haplotype (h9, *n* = 19) was found in all populations north of the Mondego (except for populations 5 and 7), and was the only one detected in six out of seven populations north of the Douro. The other most frequent haplotype was found in populations adjacent to the Mondego (h3, *n* = 8; distance from Mondego < 55 km).

*Association between genetic variation and geographical distance*

Ecological distance and not geographical distance was significantly associated with enzyme genetic distance between populations (Table 3). When ecological distance

was partitioned into its components (Mondego, Douro and Minho/Sil), the Mondego and not the other rivers were significantly associated with genetic distance. mtDNA divergence between populations was associated with ecological distance, the Mondego river in particular and, ambiguously, with geographical distance also.

Within group 2 populations, genetic distance was significantly associated with ecological distance, as defined by the Douro river. Heterozygosity difference was associated with both Douro and Minho, and allelic difference was associated with the Douro. No significant association was found between mtDNA sequence divergence and any of the independent variables.

## Discussion

### Patterns of genetic diversity

Variation at seven polymorphic nuclear loci and the mtDNA cytochrome *b* cytoplasmic locus revealed remarkable levels of genetic substructuring in the salamander *Chioglossa lusitanica*. The observed overall enzyme genetic diversity was mainly attributable to differences between populations and largely partitioned over two spatially coherent groups of populations, distributed to the south (group 1) and to the north (group 2) of the Mondego River. A deep divergence was observed between group 1 and group 2 populations that were geographically close. Support for further subdivision within the northern group was spatially consistent but statistically weak with the exception of populations adjacent to the Douro River (group 2b). Estimates of  $F_{ST} \theta$  (= 0.68) were high compared to other organisms in general (Avice 1994) and just below the highest  $F_{ST}$  value (0.80) reported among 22 species of salamanders (Larson *et al.* 1984). All loci, with the exception of two essentially uninformative ones (*PEP-A* and *PGD*), consistently described genetic variation partitioned between group 1 and group 2 populations. The high  $F_{ST}$  value is, therefore, more likely to reflect isolation for extensive periods of time than continuing low levels of gene flow per generation (Larson 1984; Larson *et al.* 1984).

Diverse values of genetic variability were observed both across group 1 and group 2 populations. Expected heterozygosity ranged from zero to 0.149, with the exception of population 3 (group 1) that exhibited an unusually high value (0.273). This resulted from intermediate allelic frequencies at otherwise nearly diagnostic loci, suggesting a recent admixture of genetically differentiated populations. Within group 2 populations, a marked decrease of genetic diversity was detected from south to north, both as measured by allelic diversity and observed heterozygosity. Moreover, both allelic diversity and heterozygosity decreased in steps coinciding with the rivers

Douro and Minho/Sil, showing parallel variation at all loci, with the exception of *PGD* that is monomorphic within group 2 populations.

The geographical distribution of the mtDNA variants was generally concordant with the pattern shown by the enzyme nuclear loci. Two genetically different mtDNA haplotype groups (A and B) were observed in *C. lusitanica*. Unambiguous support was found for a monophyletic group of mtDNA haplotypes (group B), contrasting with uncertainty on the monophyly of the others (group A) and precluding the reconstruction of a hypothetical common ancestor. Doubts on position of the root notwithstanding, the geographical distribution of the group B haplotypes closely matched that of group 2 populations as defined by the enzyme data, suggesting a process of long-term independent evolution of this group 2–group B lineage.

The observed concordance of spatial genetic variation is more likely to result from the historical biogeography of the species than from current population dynamics or selection. Two mechanisms are invoked to explain the observations: (i) an historical fragmentation in the south of the species range; and (ii) a relatively recent range expansion resulting in (a) a decrease of genetic variation to the north and (b) an increase of genetic variation in the Mondego area upon secondary contact of populations.

### Historical biogeography

*Glacial refugia.* The pattern of genetic variation suggests the former isolation of at least two population units in the southern part of the present-day species range. Following a 'molecular clock' argument and using clock calibrations for allozymes (0.05–0.1 *DNei*/MY; Maxson & Maxson 1979; Thorpe 1982; Beerli *et al.* 1996) and cytochrome *b* in the Salamandridae (0.8% sequence divergence/MY; Tan & Wake 1995; Caccone *et al.* 1997) the observed differentiation between groups (*DNei* = 0.15, *d* = 2.2%) would correspond with a genetic isolation of 1.5–3 MY, i.e. from the late Pliocene/early Pleistocene onwards. Given the timeframe involved, the major climatic and environmental changes that occurred during the Pleistocene appear to have determined the history of *C. lusitanica*. Unfortunately, the Pleistocene glaciations are not well documented for the Iberian Peninsula (except for some glaciated areas in northern and central Iberia – Ribeiro *et al.* 1987; Dias 1997; Vieira & Cordeiro 1998). The present-day distribution of *C. lusitanica* is associated with a temperate climate and covering areas historically dominated by deciduous forest. It is, therefore, not unlikely that the species followed a southward regression similar to that of the deciduous forest as reconstructed for western Iberia by Zagwijn (1992).

The two described population groups are separated by the Mondego suggesting that this river constituted a barrier to gene flow. Alternatively or additionally, dispersal

between the groups may have been limited by a zone of unfavourable habitat associated with the river. The present-day distribution shows a marked constriction in this very area (Fig. 1), where the Mondego valley is wide and constitutes a band of flat and dry landscape. Under adverse climatic conditions during the Pleistocene this may have contributed to a south-north separation as suggested by bioclimatic modelling (Teixeira 1999).

The hypothesized refugia differ in the number of alleles that they support, being low in the southern refugium and high in the northern one. A more substantial loss of allelic diversity may have been caused by strong population bottlenecking (Leberg 1992) in a comparatively small southern refugial population. Additionally, the northern group may have been composed of several small refugial populations that, not being separated one from the other by major rivers, merged upon amelioration of the climate and resulting range expansions. The presence of a variety of private alleles in populations in between Mondego and Douro supports the hypothesis of multiple refugia in this area. The Montemuro region may have been one of these as evidenced by the high frequency of the alleles that characterize group 2b (*PEP-B\*2* and *PGM-1\*2*).

*Range expansion and postglacial recolonization.* The present-day distribution of *C. lusitanica* is continuous across the Mondego river (Fig. 1). In combination with the identified refugia this suggests range expansion and secondary contact upon climatic amelioration following the Pleistocene. The presence of alleles characteristic for group 2 in a group 1 population (*ADH\*1*, *PEP-C\*1*, *PEP-D\*1* in population 3 from Lousã Mountains) suggests gene flow between the groups and helps to explain the high heterozygosity of that population (Fig. 2). Similar observations were not made for neighbouring populations (e.g. population 2, also from the Lousã mountains) south of the Mondego, indicating that introgression has been spatially restricted. The presence of the allele *PGM-1\*3F* and of non-B haplotypes in populations 5 and 6 suggests that introgression on the northern side of Mondego has also taken place. Differential introgression of genetic markers is not uncommon and has been observed both between nuclear loci and between nuclear and cytoplasmic loci (e.g. Hunt & Selander 1973; Gyllensten & Wilson 1987; for a review see Arnold 1997). To address this issue in *C. lusitanica* would require an analysis at finer spatial scale documenting the position and shape of the contact zone.

In view of the long-term (1.5–3.0 MY) independent evolution of two *C. lusitanica* lineages and the level of genetic differentiation achieved, it is tempting to speculate about their taxonomic status. A broad secondary contact zone, implying extensive introgressive hybridization, would be incompatible with species recognition under the biological species concept, but not incompatible with subspecies recognition, irrespective of the shape

(clinal or stepped) the morphological variation takes (J. Alexandrino, unpublished data).

The genetic composition of northern populations suggests that they were recently established and derived from a source located somewhere between the rivers Mondego and Douro. The range expansion proceeded to the north, following the habitat that had become newly available upon climatic amelioration. For group 1 populations range expansion to the south was problematic because of the specialized habitat requirements of the species, involving mountain brooks that are largely unavailable south of the inferred southern refugium.

The two-stepped loss of genetic variation coinciding with rivers Douro and Minho is a strong indication that rivers acted as barriers in the process of northern recolonization. The repeated founding of new populations by small numbers of animals would create, through drift, a pattern of genetic depauperation similar to the one we observed (Fig. 2). The river barrier effect can, however, by no means have been absolute because northerly range expansion has been successful. The drift of larvae, discharged from mountain streams into the rivers, may be common in this species (Thiesmeier 1994). Postmetamorphic salamanders must also be considered capable of crossing a river, accidentally or deliberately. More genetic markers than presently available would be required to investigate patterns of dispersal over a network of streams or to quantify salamander dispersal across and along rivers. Additionally, the availability of more highly variable genetic markers would alleviate the reduction of power that we experience in the analysis of populations with low variation at enzyme and mtDNA cytochrome *b* loci.

#### *Implications for conservation*

The effects of Pleistocene glaciations through fragmentation, isolation and differentiation, have been described throughout the northern hemisphere for a variety of organisms, including trees, insects, fish, salamanders and mammals (Highton & Webster 1976; Sage & Wolf 1986; Cooper *et al.* 1995; Dumolin-Lapègue *et al.* 1997; García-Marín *et al.* 1999). Most studies report the preservation of high levels of genetic diversity in populations derived from southern refugia and the loss of genetic diversity in northern recolonized areas (Larson 1984; Avise 1994; Hewitt 1996; Taberlet *et al.* 1998). However, few studies have addressed the consequences of Pleistocene climate change on the genetic architecture of organisms within any of the southern European refugia (Ragghianti & Wake 1986; Comes & Abbott 1998). The spatial pattern of genetic variation in the fire salamander, *Salamandra salamandra*, Linnaeus 1758, suggested the presence of Pleistocene refugia in northern Iberia (Alcobendas *et al.* 1996; Dopazo *et al.* 1998). Our conclusion that northern Iberian

populations resulted from a range expansion from the south argues against this scenario operating in *C. lusitanica*. Although *Salamandra* and *Chioglossa* are phylogenetically related (Titus & Larson 1995; Veith *et al.* 1998), they are ecologically dissimilar (Klewen 1991; Arntzen 1999) and biogeographically disparate histories are to be expected. The example of *C. lusitanica* provided the evidence for an unexpected natural history of populations on the Iberian Peninsula. The challenge is to evaluate to which extent other organisms with different, less explicit ecological requirements, show the same or similar patterns of fragmentation and dispersal. We anticipate that the diversity uncovered through such studies will have profound implications for the conservation of biodiversity in southern Europe.

### Acknowledgements

This work was supported by the 'Instituto da Conservação da Natureza' (ICN), the 'LIFE' program of the European Community and the 'Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica' (PRAXIS XXI/BD/5917/95 PhD grant to JA). Appropriate licensing was provided by ICN for Portugal and by the Galician and Asturian 'Junta de Medio Ambiente' for Spain. We thank M. Azevedo for technical assistance, D. Tarkhnishvili, M. García-París, P. Alexandrino, M. Branco, C. Oliveira, F. Sequeira and J. Teixeira for support and discussions.

### References

- Alcobendas M, Dopazo H, Alberch P (1996) Geographic variation in allozymes of populations of *Salamandra salamandra* (Amphibia: Urodela) exhibiting distinct reproductive modes. *Journal of Evolutionary Biology*, **9**, 83–102.
- Alexandrino J, Ferrand N, Arntzen JW (1997) Genetic variation in some populations of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela), in Portugal. *Biochemical Genetics*, **35**, 371–381.
- Arnold ML (1997) Natural hybridization and evolution. Oxford University of Press, New York.
- Arntzen JW (1981) Ecological observations on *Chioglossa lusitanica* (Caudata, Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, **1**, 187–203.
- Arntzen JW (1994) Speedy salamanders: sedentariness and migration of *Chioglossa lusitanica*. *Revista Española Herpetología*, **8**, 81–86.
- Arntzen JW (1999) *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 – Goldstreifensalamander. In: *Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas* (eds K. Grossenbacher, B. Thiesmeier), pp. 301–321. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Avise JC (1994) Molecular markers. *Natural History and Evolution* Chapman & Hall, London.
- Beerli P, Hotz H, Uzzell T (1996) Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for Aegean water frogs. *Evolution*, **50**, 1676–1687.
- Caccone A, Milinkovitch MC, Sbordoni V, Powell JR (1997) Mitochondrial DNA rates and biogeography in European newts (genus *Euproctus*). *Systematic Biology*, **46**, 126–144.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, **19**, 233–257.
- Comes HP, Abbott RJ (1998) The relative importance of historical events and gene flow on the population structure of a Mediterranean ragwort *Senecio gallicus* (Asteraceae). *Evolution*, **52**, 355–367.
- Cooper SJB, Ibrahim KM, Hewitt GH (1995) Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology*, **4**, 49–60.
- Dias JMA (1997) Evolução da linha de costa, em Portugal, desde o último máximo glaciário até à actualidade: síntese dos conhecimentos. *Estudos do Quaternário*, **1**, 53–66.
- Dopazo H, Boto L, Alberch P (1998) Mitochondrial DNA variability in viviparous and ovoviviparous populations of the urodele *Salamandra salamandra*. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**, 365–378.
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V, Petit RJ (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, **146**, 1475–1487.
- Felsenstein J (1993) *PHYLIP (Phylogeny Inference Package)*, Version 3.5. Distributed by the author. University of Washington, Seattle.
- Frick L (1983) An electrophoretic investigation of the cytosolic di- and tripeptidases of fish: molecular weights, substrate specificities, and tissue and phylogenetic distributions. *Biochemical Genetics*, **21**, 309.
- García-Marín J, Utter FM, Pla C (1999) Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*, **82**, 46–56.
- García-París M, Alcobendas M, Alberch P (1998) Influence of the Guadalquivir river basin on the mitochondrial DNA evolution of *Salamandra salamandra* (Caudata: Salamandridae) from southern Spain. *Copeia*, **1998**, 173–176.
- Gyllensten UB, Wilson AC (1987) Interspecific mitochondrial DNA transfer and the colonization of Scandinavia by mice. *Genetical Research Cambridge*, **49**, 25–29.
- Harris H, Hopkinson DA (1976) *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. North-Holland Publishing Co, Amsterdam.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247–276.
- Highton R, Webster TP (1976) Geographic protein variation and divergence in populations of the salamander *Plethodon cinereus*. *Evolution*, **30**, 33–45.
- Hunt WC, Selander RK (1973) Biochemical genetics of hybridisation in European house mice. *Heredity*, **31**, 11–33.
- Klewen R (1991) *Die Landsalamander Europas*: 1. A. Ziemsen-Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- Larson A (1984) Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae. *Evolutionary Biology*, **17**, 119–217.
- Larson A, Wake DB, Yanev KP (1984) Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics*, **106**, 293–308.
- Leberg PL (1992) Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, **42**, 447–494.
- Lessa E (1990) Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Systematic Zoology*, **39**, 242–252.
- Lewis PO, Zaykin D (1999) *Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data, Version 1.0 (d12)*. Distributed at the internet at <http://chee.unm.edu/gda/>.
- Manly BFJ (1996) *RT – A program for randomization testing, Version 2.0. Centre for applications of statistics and mathematics (CASM)*. University of Otago, New Zealand.

## GENETIC SUBDIVISION IN A SALAMANDER 781

- Matson RH (1989) Avian peptidase isozymes: tissue distributions, substrate affinities, and assignment of homology. *Biochemical Genetics*, **27**, 137–151.
- Maxson LR, Maxson RD (1979) Comparative albumin and biochemical evolution in Plethodontid salamanders. *Evolution*, **33**, 1057–1062.
- Moritz C, Schneider CJ, Wake DB (1992) Evolutionary relationships within the *Ensatina escholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, **41**, 273–291.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Phillips CA (1994) Geographic distribution of mitochondrial DNA variants and the historical biogeography of the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Evolution*, **48**, 597–607.
- Ragghianti M, Wake D (1986) Genic variation and its evolutionary implications in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Herpetologica*, **42**, 206–214.
- Ribeiro O, Lautensach H, Daveau S (1987) *Geografia de Portugal. I. A posição geográfica e o território*. Edições João Sá da Costa. Lisboa.
- Roe B, Ma D, Wilson R, Wong J (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 9759–9774.
- Sage RD, Wolff JO (1986) Pleistocene glaciations, fluctuating ranges and low genetic variability in a large mammal (*Ovis dali*). *Evolution*, **40**, 1092–1095.
- Sambrook E, Fritsch F, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sequeira F, Teixeira J, Alexandrino J, Lima V, Ferrand N (1996) Distribución de *Chioglossa lusitanica* en Portugal. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, **7**, 7.
- Slatkin M (1981) Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics*, **99**, 323–335.
- StatSoft (1993) *STATISTICA for Windows*, release 4.5. StatSoft Inc., Tulsa, USA.
- Swofford DL (1993) *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1*. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A, Cosson J (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453–464.
- Tan AM, Wake DB (1995) MtDNA phylogeography of the California newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **4**, 383–394.
- Tarkhnishvili DN, Thorpe RS, Arntzen JW (2000) Population genetic structure and geographical subdivision of the Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**, 414–422.
- Teixeira J (1999) *Biogeografia de Salamandra-lusitânica: utilização de Sistemas de Informação Geográfica na modelação da distribuição*. MSc Thesis. University of Porto, Portugal.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**, 767–782.
- Thiesmeier B (1994) Trophische Beziehungen und Habitatpräferenzen sympatrisch lebender *Salamandra salamandra* und *Chioglossa lusitanica*-Larven. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde*, **17**, 119–126.
- Thorpe JP (1982) The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **13**, 139–168.
- Titus TA, Larson A (1995) A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary radiation of the salamander family Salamandridae. *Systematic Biology*, **44**, 125–151.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Wright DA, Richards CM (1982) Peptidase isozymes of the leopard frog *Rana pipiens*: properties and genetics. *Journal of Experimental Zoology*, **221**, 283–293.
- Veith M, Steinfartz S, Zardoya R, Seitz A, Meyer A (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.
- Vieira GT, Cordeiro AMR (1998) Geomorfologia periglaciária em Portugal: estado do conhecimento. *Procesos biofísicos actuales en medios fríos. Publicacions de la Universitat de Barcelona*, 347–371.
- Zagwijn WH (1992) Migration of vegetation during the Quaternary in Europe. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, **153**, 9–20.

---

Our research group is interested in population genetics, biogeography and conservation, with the emphasis on vertebrate species of the Iberian Peninsula. The current study is part of the PhD thesis by João Alexandrino on the evolutionary biology of the endemic Iberian salamander *Chioglossa lusitanica*. Elsa Froufe worked on the project for her graduate thesis in Biology and has recently taken up a project on hybridizing newt species in Central Portugal. Pim Arntzen is a visiting scientist, working on the evolutionary biology, ecology and systematics of amphibians. Nuno Ferrand is Associate Professor and heads the Unit of Animal Genetics and Conservation, at the Centre for the Study of Animal Sciences. He is interested in a variety of questions in evolutionary and conservation genetics.

---

## **Nested clade analysis of phylogeographic data in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia : Urodela)**

J. ALEXANDRINO, J. W. ARNTZEN and N. FERRAND

*Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Praça Gomes Teixeira, 4050 Porto, Portugal; Centro de Estudos de Ciência Animal, ICETA, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte, Crasto, Vairão, 4480 Vila do Conde, Portugal.*

### **Abstract**

**The golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*, is a streamside species distributed in the northwest of Iberian Peninsula. We gathered cytochrome b mitochondrial sequence DNA data from samples across the species range and used nested clade distance analysis to assess evolutionary processes explaining the geographical distribution of mtDNA diversity in *Chioglossa lusitanica*. Significant association was observed between genetic structure and geography. The geographical patterns were explained by past fragmentation and restricted gene flow. Inferences were largely concordant with previous hypotheses (from allozyme data) involving an old fragmentation event and secondary contact near the Mondego River. The hypothesized range expansion to the north from a southern refuge was compatible with mtDNA variation, but not inferred from nested clade analysis. This is probably due to the low levels of genetic divergence observed in the northernmost populations.**

*Keywords: Chioglossa lusitanica, golden-striped salamander, mtDNA phylogeny, nested clade analysis, population structure vs. population history*

*Submitted to Molecular Ecology*

## **Introduction**

Intraspecific patterns of genetic diversity are determined by both historical and contemporary processes. Conventional approaches to describing population structure and estimating gene flow (Wright 1931, see Neigel 1997 for a review) interpret spatial patterns of allelic distribution as a function of genetic drift and migration. They fail to discriminate between contemporary gene flow and historical processes such as fragmentation and range expansion. Templeton *et al.* (1995) proposed a new class of phylogeographic statistics that takes more advantage of information contained in molecular genetic data by testing the geographical associations at different hierarchical levels of an estimated gene tree. Predictions from coalescent theory are then used to interpret the results of this “nested clade analysis” (see Templeton 1998 for a review) and to make spatio-temporal inferences about the evolutionary processes (fragmentation, range expansion or restricted gene flow) likely to have contributed to the observed patterns.

Geographic patterns of genetic diversity in salamanders may reflect historical rather than contemporary processes because of the low mobility and strict ecological requirements of these organisms (Slatkin 1981; Larson *et al.* 1984). Indeed, salamanders of the genus *Ambystoma* were first used to exemplify nested clade analysis because they provide an adequate model, showing the effects of fragmentation, range expansion and isolation by distance (Templeton *et al.* 1995). The golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* Bocage 1864, is a peculiar streamside species with a distribution restricted to north-western Iberia. These salamanders exhibit a suite of morpho-physiological traits that determine a strong dependence on brook vicinities and other moist habitats which is likely to result in directional dispersal along watercourses (Arntzen 1981; 1994). We have recently discovered two distinct evolutionary lineages in *C. lusitanica* using allozyme and mitochondrial DNA (mtDNA) variation (Alexandrino *et al.* 2000). The spatial pattern of genetic variation reflected historical fragmentation and range expansion.

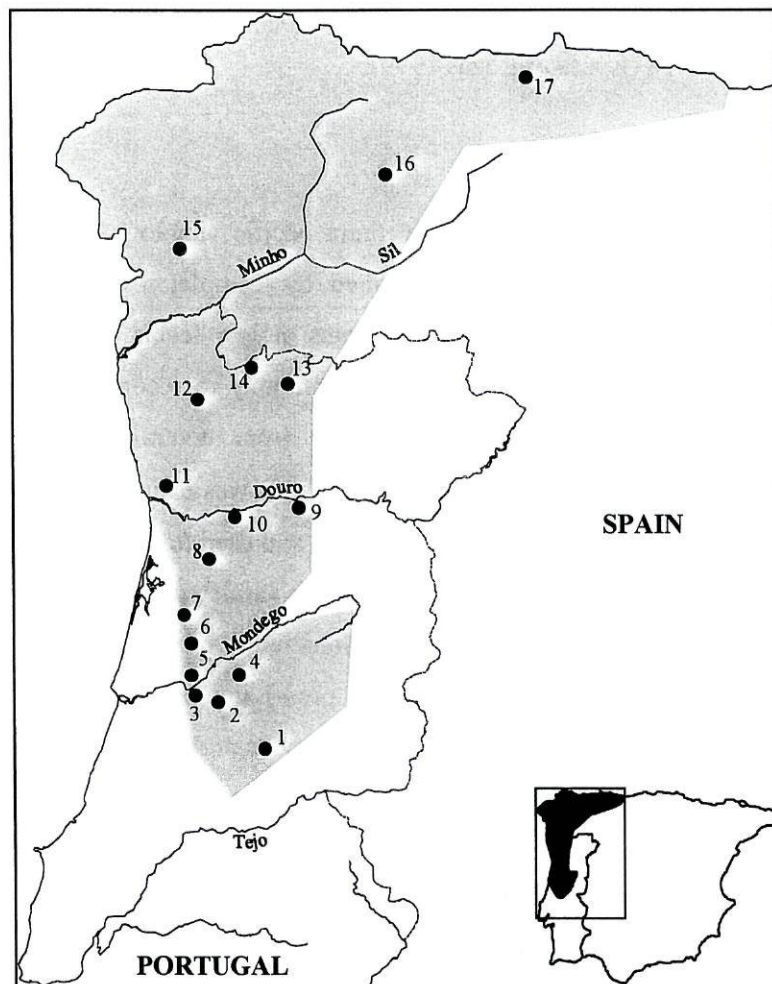
We here extend our work through mitochondrial sequencing of the cytochrome b gene to 700bp in 124 individuals from across the species range. We apply nested clade analysis to assess the relative contribution of historical vs. contemporary evolutionary processes to the geographical patterns of mtDNA

variation. In this way we test and refine hypotheses put forward under a more descriptive framework (Alexandrino *et al.* 2000).

## Materials and methods

### Data collection

Salamanders were collected from 17 localities across north-western Iberia covering the species range (Figure 1).



**Figure 1** – The distribution of *Chioglossa lusitanica* in the northwestern Iberian Peninsula (shaded areas, from Arntzen, 1999) and the study localities: 1, Muradal, Foz de Giraldo; 2, Lousã, C. Pêra; 3, Lousã, Vilarinho; 4, Açor, Margaraça; 5, Várzeas; 6, Buçaco; 7, Saide; 8, Covelo; 9, Tarouca; 10, Montemuro; 11, Valongo; 12, Bom Jesus; 13, Barroso; 14, Gerês; 15, Pontevedra; 16, Fonsagrada; 17, Salas.

DNA extraction, PCR amplification of cytochrome b and sequencing protocols are as in Alexandrino *et al.* (2000). A 840 bp fragment of the Cyt b mtDNA gene was amplified by PCR using the primers MVZ15 (Moritz *et al.* 1992; Tan and Wake 1995) and cytb702 (5'-GGCAAATAGGAAGTATC ATTCTG-3'; Moritz *et al.* 1992, modified). Both primers were used for direct sequencing of the PCR products. Sequences of 700 bp, corresponding to 16,309 (5' end) and 17,008 (3' end) of the *Xenopus laevis* mtDNA (Roe *et al.* 1985) were obtained for 124 individuals (two to 11 individuals per population). The sequences were aligned using BioEdit, version 1.8 (Hall 1999) with no indels. Nucleotide diversity ( $\pi$ ), its standard error and sequence divergence between haplotypes were calculated using DnaSP version 3.14 (Rozas & Rozas 1999).

#### *Nested clade analysis*

*Haplotype network estimation.* The intraspecific haplotype network was reconstructed using the algorithm described by Templeton *et al.* (1992). The method was designed to estimate phylogenies at low levels of divergence and begins by calculating the overall limits of parsimony to reconstruct intraspecific relationships of haplotypes using a statistic from neutral coalescent theory (Hudson, 1989). The parameter  $\theta$  (Watterson 1975) was estimated for our sample with DnaSP version 3.14 (Rozas & Rozas 1999) and used to solve  $H$  in equation 10 of Hudson (1989). Once the use of parsimony was validated, the haplotype network was estimated by finding haplotype connections with probabilities above the 0.95 limit. TCS version 1.0 (Clement *et al.* in press) implements the algorithm in Templeton *et al.* (1992). It was used to estimate those probabilities and for network construction.

*Nested design.* We used the rules given in Templeton *et al.* (1987) and Templeton & Sing (1993) to define an evolutionary clade hierarchy upon the intraspecific haplotype network. The method starts from the tips of the network by nesting haplotypes ("zero step clades") separated by one mutational change within "one-step clades", and proceeds step by step to identify higher level clades until the final level of nesting comprehends the entire network.

*Testing for geographical association.* The nested design was used to investigate geographical association of clades and nested clades in two ways. First, clades with genetic and/or geographical variation were tested against their geographical locations through a permutational contingency analysis (Templeton & Sing 1993, Templeton *et al.* 1995). A more objective analysis was conducted using information on geographical distances as described in Templeton *et al.* (1995): clade distance ( $D_c$ ) for the geographical spread of a clade and nested clade distance ( $D_n$ ) for the distance of a clade from the geographical centre of the nested clade. These distances were then contrasted between interior clades and tip clades by calculating within each nested level the difference between the average interior distance and the average tip distance (I- $T D_c$  and I- $T D_n$ ). This interior vs. tip contrast of clades corresponds to a old vs. young contrast and, to a lesser extent, common vs. rare under to expectations from neutral coalescent theory (Crandall & Templeton 1993). We used these predictions to help determine interior vs. tip status by calculating outgroup weights as described in Castelloe & Templeton (1994). Observed  $D_c$  and  $D_n$  values were then compared to a distribution of  $D_c$  and  $D_n$  generated by random permutations of clades against sampling locations with GeoDis version 2.0 (Posada *et al.* 2000). One thousand permutations were performed to obtain statistical inferences at  $\alpha=5\%$ . The null hypotheses were i) no geographical association of clades and ii) clade dispersal distances are not significantly different than expected at random. Inferences about the population processes underlying the observed clade dispersal patterns followed the Templeton *et al.* (1995) inference key.

## Results

### *MtDNA variation*

Cytochrome b sequencing of 124 individuals of *Chioglossa lusitanica* yielded 34 variable positions describing 30 distinct haplotypes. Sequence divergence ranged from 0.14% to 2.14% with an overall nucleotide diversity of 0.99%. Seven nucleotide substitutions were observed at the first codon position, five at the

second position, and 22 at the third position, underlying eight aminoacid replacements (Table 1).

**Table 1** – Variable positions in the 700 bp segment of the cytochrome b gene defining 30 different haplotypes and their distribution across 17 populations of *Chioglossa lusitanica*. Transversions are indicated by asterisks. The numbers below nucleotide positions indicate the respective codon position. Boldface characters indicate aminoacid replacement substitutions.

Haplotypes	Nucleotide position																																			
	1	3	5	0	1	5	7	8	9	9	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	6	6	6	
	5	2	4	2	4	2	5	3	3	7	2	5	9	2	7	5	6	4	8	3	9	7	9	7	6	2	2	7	0	5	4	8	9	8		
	*	*			*					*					*				*															*		
	3	2	3	3	3	2	1	3	1	2	3	3	1	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	1	1	1	2		
<i>h1</i>	c	g	t	a	t	g	t	t	g	a	t	t	c	t	a	a	a	a	c	t	a	c	a	t	t	t	t	c	c	a	t	a	t	t		
<i>h2</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h3</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h4</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h5</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h6</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h7</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h8</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h9</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h10</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h11</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h12</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h13</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h14</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h15</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h16</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h17</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h18</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h19</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h20</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h21</i>	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h22</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h23</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h24</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h25</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h26</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h27</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h28</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h29</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>h30</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Table 1 - Continued.

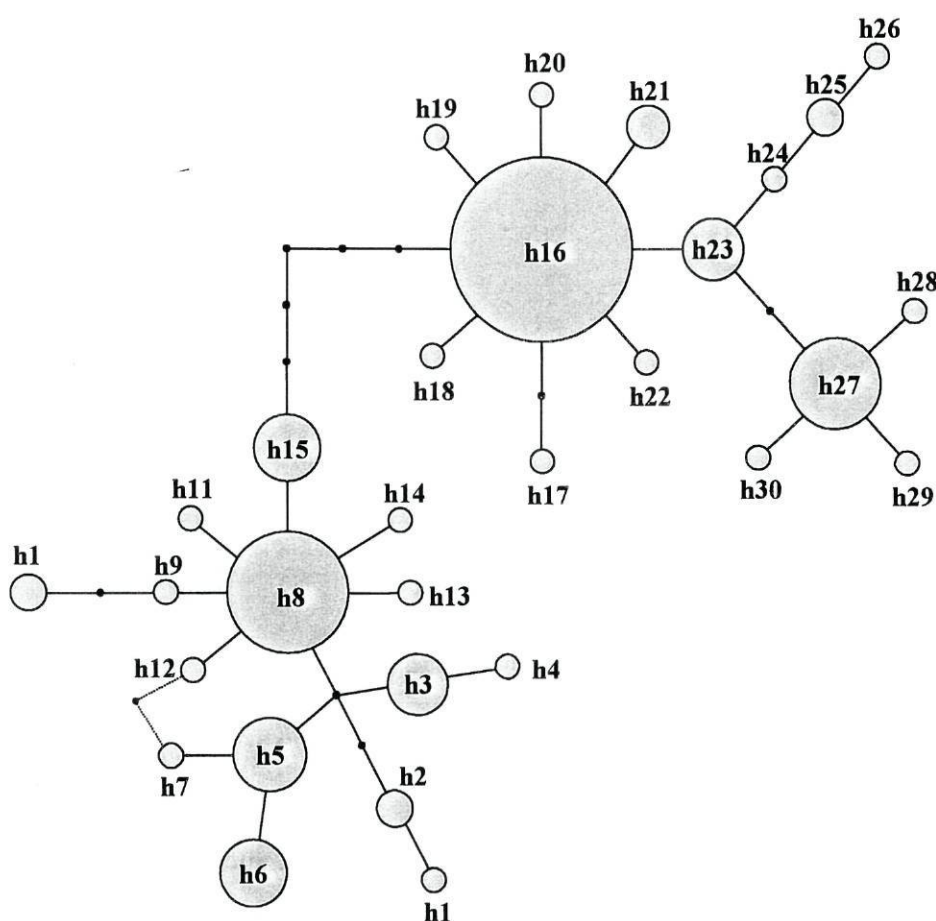
Haplotypes	Locality																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>h1</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h2</i>	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h3</i>	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h4</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h5</i>	-	-	2	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h6</i>	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h7</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h8</i>	8	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h9</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h10</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h11</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h12</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h13</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h14</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h15</i>	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h16</i>	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	6	2	1	9	9	6	6
<i>h17</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h18</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>h19</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>h20</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h21</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>h22</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>h23</i>	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h24</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>h25</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>h26</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>h27</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	7	-	-	-	-	-	-	-
<i>h28</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>h29</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>h30</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-

Twenty two haplotypes were found at single localities and eight (*h2*, *h5*, *h8*, *h15*, *h16*, *h21*, *h23* and *h27*) were observed in two or more localities (Table 1). Haplotype *h16* was the most frequently observed haplotype ( $n=47$ ) and was found in eight populations north of the Mondego River. The otherwise most frequent haplotype (*h8*,  $n=13$ ) was found in populations south of the Mondego. All but two of 12 localities with more than five individuals sampled were polymorphic with

two to five haplotypes differing by one to four mutational changes ( $\pi$  ranging from  $0.0003 \pm 0.0004$  to  $0.0026 \pm 0.0018$ ). The exceptions were locality 17 which was monomorphic for haplotype h16 and locality 6 with one haplotype differing from the other three by 10-12 mutational changes ( $\pi = 0.0093 \pm 0.0055$ ).

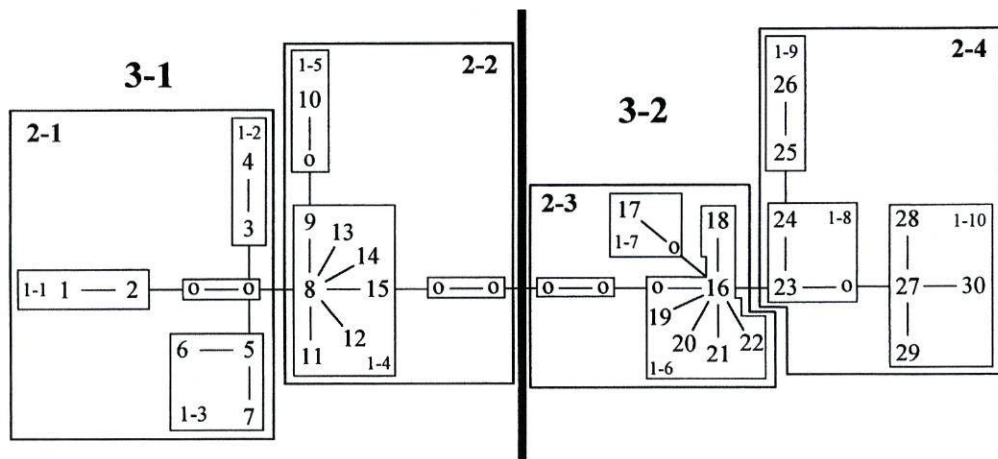
*Nested clade analysis*

*Haplotype network and nested design.* The parsimony criterium appeared to be justified to reconstruct the haplotype relationships of *C. lusitanica*. With  $\theta = 0.012$



**Figure 2** – Network for cytochrome b haplotypes observed in 17 populations of *Chioglossa lusitanica*. The network was estimated under the 95% statistical limits of parsimony using the algorithm in Templeton *et al.* (1992). Circle size represents haplotype frequency and dots represent hypothetical haplotypes.

( $n=30$ )  $H$  was estimated at 0.036, indicating that a difference observed at any given site between two randomly drawn haplotypes was unlikely to have arisen from more than one mutational step. The maximum number of mutational steps between haplotypes allowing parsimonious connections with a probability  $P>0.95$  was 11 steps. Haplotype network estimation using parsimony within this limit resulted in a single network (Fig. 2). The single loop of ambiguity found in the network (h7 connecting to h5 or to h12) represented a less parsimonious alternative and was not considered for the nesting design shown in Figure 3.



**Figure 3** – Maximum parsimony network and corresponding nested design for cytochrome b haplotypes observed in 17 populations of *Chioglossa lusitanica*. Note that the numbers are given without the “h” prefix. Hypothetical haplotypes are represented by “0”. Thin-lined polygons enclose 1-step clades and are designated by “1-n”; thick-lined polygons enclose 2-step clades (“2-n”); the thick line separates 3-step clades (3-1 and 3-2).

*Nested contingency analysis.* Nested contingency analysis revealed significant association of clades and sampling locations at all clade levels (Table 2). Two 1-step clades (1-3 and 1-4) and two 2-step clades (2-1 and 2-4) showed significant levels of geographical association, while the null hypothesis of no geographical association could be rejected at all higher-level categories (3-step clades and the entire cladogram). The geographical distance analysis showed significant differences for clade ( $D_c$ ) and nested clade ( $D_n$ ) distances (Fig. 4).

**Table 2** – Nested contingency analysis of geographical associations for cytochrome b data from *Chioglossa lusitanica*. Clades not showing genetic or geographical variation are excluded (no test is possible within such nested categories).

Clade	Permutational $\chi^2$ statistic	Probability
1-1	0.750	1.000
1-3	10.833	0.014*
1-4	30.077	0.042*
1-6	32.835	0.443
1-8	2.400	0.331
1-10	0.800	1.000
2-1	15.279	0.000*
2-2	3.261	0.669
2-3	3.649	1.000
2-4	42.000	0.000*
3-1	39.257	0.000*
3-2	65.998	0.000*
Total cladogram	114.633	0.000*

\* Significant at the 0.05 level

The inferences made from the key in Templeton *et al.* (1995) and the geographical distribution of clades (Fig. 5) are given in Table 3. Restricted gene flow with isolation-by-distance was inferred for three nested clades (1-3, 2-1 and 3-2) whereas past fragmentation was the most likely explanation for the patterns observed at nested levels 1-4, 2-4, 3-1 and for the entire network.

**Table 3** – Demographic inferences from the nested clade distance analysis in *Chioglossa lusitanica*.

Clade	Inference chain	Inferred pattern
Haplotypes nested in 1-3	1-2-3-4-NO	Restricted gene flow with isolation-by-distance
Haplotypes nested in 1-4	1-2-3-5-15-NO	Past fragmentation
One-step clades nested in 2-1	1-2-3-4-NO	Restricted gene flow with isolation-by-distance
One-step clades nested in 2-4	1-2-3-5-15-NO	Past fragmentation
Two-step clades nested in 3-1	1-2-3-5-15-NO	Past fragmentation
Two-step clades nested in 3-2	1-2-3-4-NO	Restricted gene flow with isolation-by-distance
Three-step clades nested in the entire cladogram	1-2-3-5-15-NO	Past fragmentation

Haplotypes			1-step clades			2-step clades			3-step clades		
Clade	Dc	Dn	Clade	Dc	Dn	Clade	Dc	Dn	Clade	Dc	Dn
<i>h1</i>	0	6.50	1-1	10.40	14.82	2-1	16.35 <sup>S</sup>	30.38	3-1	32.63 <sup>S</sup>	122.15 <sup>S</sup>
<i>h2</i>	<b>13.00</b>	<b>9.75</b>									
I-T	13.00	3.25	1-2	0 <sup>S</sup>	11.62 <sup>S</sup>						
<i>h3</i>	0	0									
<i>h4</i>	0	0	1-3	17.79	16.76 <sup>L</sup>						
<i>h5</i>	<b>18.25</b>	<b>17.83<sup>L</sup></b>									
<i>h6</i>	0 <sup>S</sup>	14.29	I-T	14.33 <sup>L</sup>	4.07 <sup>L</sup>						
<i>h7</i>	0	15.43									
I-T	18.25 <sup>L</sup>	3.38	1-4	26.97	26.22						
<i>h8</i>	<b>20.54<sup>S</sup></b>	<b>23.93<sup>S</sup></b>									
<i>h9</i>	<b>0</b>	<b>20.03</b>	I-T	0	18.75						
<i>h11</i>	0	20.02									
<i>h12</i>	0	20.02	I-T	26.97	7.47						
<i>h13</i>	0	21.21									
<i>h14</i>	0	21.21	2-2	26.35 <sup>S</sup>	33.98 <sup>L</sup>						
<i>h15</i>	<b>2.40<sup>S</sup></b>	<b>31.89<sup>L</sup></b>									
I-T	14.69 <sup>S</sup>	5.21 <sup>L</sup>	I-T	10.00 <sup>L</sup>	3.60 <sup>L</sup>						
<i>h10</i>											
<i>h16</i>	<b>150.02</b>	<b>147.68</b>	1-6	148.55	148.41	2-3	148.87	146.59 <sup>L</sup>	3-2	139.49	152.81 <sup>L</sup>
<i>h18</i>	0	122.64									
<i>h19</i>	0	99.92									
<i>h20</i>	0	144.37									
<i>h21</i>	77.76	133.09	1-7	0	141.69						
<i>h22</i>	0	168.51									
<i>h17</i>			I-T	148.55	6.71						
<i>h23</i>	5.37	5.94									
<i>h24</i>	0	7.52	1-8	6.54 <sup>S</sup>	64.76 <sup>L</sup>						
I-T	5.37	-1.58									
<i>h25</i>	0	0	1-9	0	55.21						
<i>h26</i>	0	0									
<i>h27</i>	<b>13.16</b>	<b>10.38</b>	2-4	50.92 <sup>S</sup>	119.54 <sup>S</sup>						
<i>h28</i>	0	4.27									
<i>h29</i>	0	4.27	I-T	97.95 <sup>L</sup>	27.06 <sup>L</sup>						
<i>h30</i>	0	4.27									
I-T	13.16	6.10	1-10	10.93 <sup>S</sup>	41.60 <sup>S</sup>						
			I-T	-2.20	20.43 <sup>L</sup>						

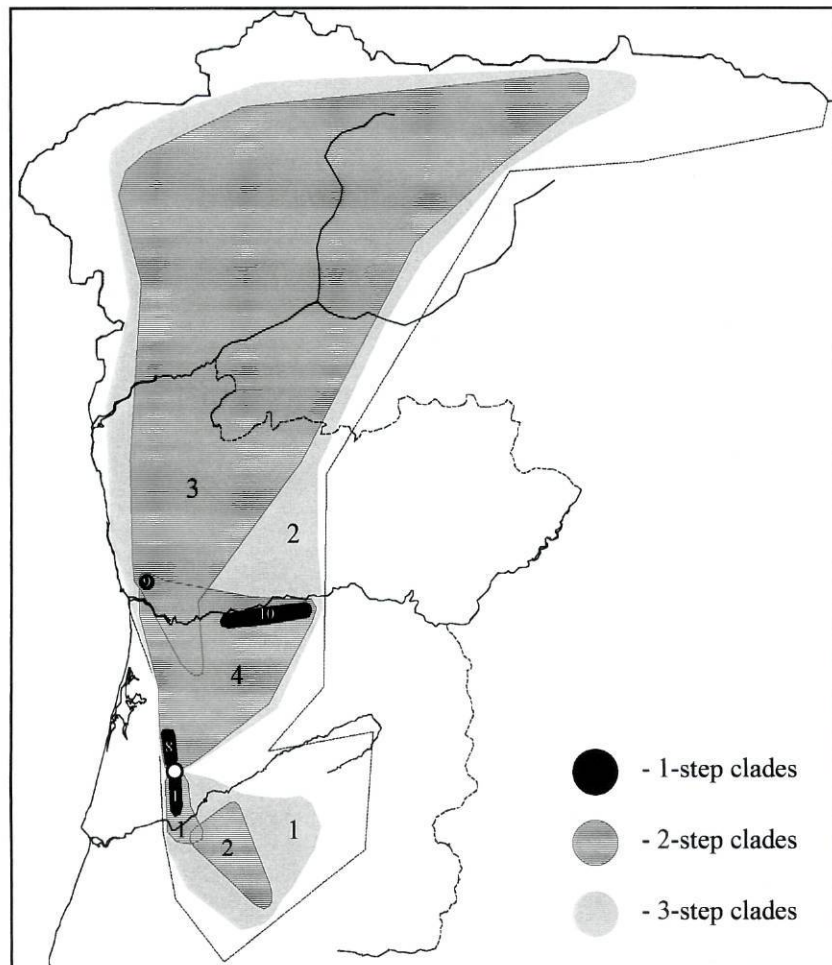
**Figure 4** – Nested clade distance analysis of cytochrome b haplotypes observed in *Chioglossa lusitanica*. Brackets reflect the nesting structure (Fig. 3). Dc and Dn are clade and nested clade distances, respectively (for details see Templeton *et al.* 1995). Interior vs. tip contrasts for both Dc and Dn are indicated with “I-T” in the corresponding clade, with interior clades given in italics bold type. For clades 1-8 and 2-1 the tip interior/status is inferred from coalescent theory (Castelloe & Templeton 1994), and the results of “I-T” are given in italics. Superscript S and superscript L indicate distance measures, respectively, significantly smaller or larger than expected under random distribution of haplotypes.

## Discussion

### *Population structure vs. population history*

Nested clade distance analysis of mtDNA sequence variation revealed a high level of phylogeographic structure in the salamander *Chioglossa lusitanica*. The rejection of the null hypothesis of random distribution of haplotypes was common at the higher-level nestings reflecting deep lineage divergence and increased

statistical power (Templeton 1998). Both population structure and population history shaped the observed geographical patterns of mtDNA variation in *C. lusitanica*. Past fragmentation and restricted gene flow were the processes inferred to explain the geographical associations of haplotypes (Table 3).



**Figure 5** – Geographical representation of nested clade hierarchical design for the cytochrome b haplotype network of *Chioglossa lusitanica*. Numbers identify clades within a certain clade-level (see Fig. 3). Note that geographical ranges are the same for clades 1-3 and 2-1, 1-4 and 2-2 and 1-6 and 2-3. The white circle represents the Buçaco Mountains.

The oldest event inferred for *C. lusitanica* was past fragmentation with the diverged clades, 3-1 and 3-2, distributed south and north of the Buçaco Mountains respectively (near the Mondego; Fig. 5). Within these two regions, populations appear to have been subject to past fragmentation and restricted gene flow. In the

south, the observations indicate fragmentation over the mountains of Muradal-Açor-Lousã versus Lousã-Buçaco (clades nested in 1-4 and 3-1) and restricted gene flow within this area (clades nested in 1-3 and 2-1). In the north, restricted gene flow is likely to have been widespread from Buçaco to the northwestern of Spain (clades nested in 3-2). Within the northern region, fragmentation appears to have affected the southern parts between Buçaco and the Douro River (clades nested in 2-4).

#### *Biogeographical interpretations*

*Vicariance and secondary contact.* The deep mtDNA genetic divergence observed between two assemblages of *C. lusitanica* was concordant with allozyme genetic diversity (Alexandrino *et al.* 2000). The inferred fragmentation and the depth of divergence ( $d=1.5\%$ , for clades 3-1 clade 3-2) support the hypothesis of late Pliocene/early Pleistocene vicariance across the Mondego River (Alexandrino *et al.* 2000). The two mtDNA lineages were only found together at Buçaco (population 6). This is more likely to be due to secondary contact than to insufficient time for coalescence to occur. Allozyme variation in populations from between Lousã (population 3) and Buçaco also suggested the direct contact between the southern and the northern group of populations (Alexandrino *et al.* 2000). This is concordant with restricted gene flow inferred for this relatively small area (clades, 1-3 and 2-1) from nested clade analysis. A low level of gene flow in areas adjacent to the Mondego indicates a barrier to gene flow, composed by the river and an associated zone of generally unfavourable habitat (Teixeira 1999; Alexandrino *et al.* 2000), strengthening the hypothesis of a local south-north separation under adverse climatic conditions during the Pleistocene (Alexandrino *et al.* 2000). After climatic amelioration contact between populations was probably reestablished at a low level of gene flow and without extensive introgression. Recurrent events of fragmentation/restricted gene flow during the Pleistocene in a zone of decreased salamander density may have contributed to the further divergence of lineages.

The fragmentation events inferred in the areas south and north of the Mondego, indicate that additional barriers have shaped the present phylogeographic structure of *C. lusitanica*. Two populations immediately south of

the Douro River, in particular, showed high genetic distinctiveness (populations 9 and 10, clade 1-10, see Fig. 5), which parallels the observed high frequency of private alleles at some allozyme loci (Alexandrino *et al.* 2000). This supports the hypothesis that during the Pleistocene the Montemuro area harboured several isolated refugial populations of the northern lineage (Alexandrino *et al.* 2000).

*Range expansion.* High levels of genetic divergence in the south contrast with low levels of genetic divergence in the northern part of the *C. lusitanica* range. The relative genetic uniformity in populations north of the Douro, with a haplotype interior to the haplotype network predominating (Table 1), reflects their relatively recent origin, through colonization by a small number of founders. The presence of some rare haplotypes derived from the common interior one at clade 1-6, however, suggests that time since colonization was sufficient for new mutations to have arisen. Similar patterns were observed at clade 1-4, suggesting range expansion from Lousã-Açor to the southeast. However, this inference was not made from nested clade analysis which may reflect lack of statistical power in the detection of geographical associations of rare haplotypes at clades with low levels of divergence (Templeton 1998).

### *Conclusions*

The historical scenario of Pleistocene vicariance for *C. lusitanica* advanced by Alexandrino *et al.* (2000) was confirmed by nested clade analysis of a substantially enlarged mtDNA data set. Hitherto unrecognized phylogeographic structure suggests that habitat fragmentation may have been quite common in the southern range of this salamander. Range expansion inferred from allozyme studies was supported by descriptive interpretations of mtDNA data but not from formal nested clade analysis. Indeed, the inference of range expansion from nested clade analysis may be problematic i) in recently colonized areas for reasons described above (lack of statistical power), and ii) because not all patterns likely to arise from range expansion are incorporated in the inference key (Templeton 1998).

The observed concordance of allozyme and mtDNA variation across two diverged population assemblages in *C. lusitanica* brings up again the question of

their taxonomic status. We described morphological differentiation for the two groups here recognized (Alexandrino *et al.* submitted). Any taxonomic revision should not only rely on patterns of variation concordant across the population assemblages, but also assess the level of gene flow in the putative secondary contact zone. This requires a fine scale genetic study of this area for example through the use of highly variable nuclear markers such as microsatellites. Such data would also provide important guidelines on how these two groups of *C. lusitanica* should be managed for conservation.

### Acknowledgements

This work was supported by the 'Instituto da Conservação da Natureza' (ICN), the 'LIFE' program of the European Community and the 'Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica' (PRAXIS XXI/BD/5917/95 PhD grant to JA). Licensing was provided by ICN for Portugal and by the Galician and Asturian 'Junta de Medio Ambiente' for Spain. We thank P. Alexandrino, M. Branco, M. García-París, C. Oliveira, F. Sequeira, D. Tarkhnishvili and J. Teixeira for support and discussions.

### References

- Alexandrino J, Froufe E, Arntzen JW, Ferrand N (2000) Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology*, **9**, 771-781.
- Alexandrino J, Ferrand N, Arntzen JW. Morphological variation in two genetically distinct groups of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Submitted*.
- Arntzen JW (1981) Ecological observations on *Chioglossa lusitanica* (Caudata, Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, **1**, 187-203.
- Arntzen JW (1994) Speedy salamanders: sedentariness and migration of *Chioglossa lusitanica*. *Revista Española Herpetología*, **8**, 81-86.

- Arntzen JW (1999) *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 - Goldstreifensalamander. Pp. 301-321 in: Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas. (eds. K. Grossenbacher and B. Thiesmeier). AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Castelloe J, Templeton AR (1994) Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **3**, 102-113.
- Clement M, Posada D and Crandall K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, in press.
- Crandall KA, Templeton AR (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, **134**, 959-969.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hudson RR (1989) How often are polymorphic restriction sites due to single mutation? *Theoretical Population Biology*, **36**, 23-33.
- Larson A, Wake DB, Yanev KP (1984) Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics*, **106**, 293-308
- Moritz C, Schneider CJ, Wake DB (1992) Evolutionary relationships within the *Ensatina escholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, **41**, 273-291.
- Neigel JE (1997) A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, **28**, 105-128.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000) GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, **9**, 487-488.
- Roe B, Ma D, Wilson R, Wong J (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *The Journal of Biological Chemistry*, **260**, 9759-9774.

- Rozas J, Rozas R (1999) DnaSP, Version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, **15**, 174-175.
- Slatkin M (1981) Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics*, **99**, 323-335.
- Tan AM, Wake DB (1995) MtDNA phylogeography of the California newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **4**, 383-394.
- Teixeira J (1999) *Biogeografia de Salamandra-lusitânica: utilização de Sistemas de Informação Geográfica na modelação da distribuição*. MSc. Thesis. University of Porto, Portugal.
- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, **117**, 343-351.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**, 619-633.
- Templeton AR, Sing CF (1993) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, **134**, 659-669.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**, 767-782.
- Templeton AR (1998) Nested clade analysis of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**, 381-397.
- Watterson GA (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, **7**, 256-276.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.

## **Allozyme variation at the contact zone of two genetically distinct groups of the golden-striped salamander *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela), with the description of a new subspecies**

J. ALEXANDRINO, J. W. ARNTZEN and N. FERRAND

*Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Praça Gomes Teixeira, 4050 Porto, Portugal; Centro de Estudos de Ciência Animal, ICETA, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte, Crasto, Vairão, 4480 Vila do Conde, Portugal.*

### **Abstract**

We use seven polymorphic enzyme loci to describe nuclear genetic variation across a secondary contact zone in the salamander *Chioglossa lusitanica* in central Portugal. A northern and a southern form are genetically well differentiated, supporting data previously obtained from mitochondrial DNA and morphology. Four diagnostic loci intergradated over a 15-21 km interval, indicating hybridization and introgression between the groups. Position and shape of clines are not concordant when comparing nuclear-nuclear and nuclear-cytoplasmic loci. The absence of linkage disequilibrium in populations central to the contact zone indicates that the two forms admix freely. The presence of the northern form south of the Mondego shows that this river is not an absolute barrier to salamander dispersal. Rather, dispersal and introgression appear to be limited by a zone of unfavourable habitat associated with the Mondego river valley. Because the two forms of *C. lusitanica* are well differentiated but not genetically incompatible they deserve taxonomic recognition at the subspecific level. We describe the southern form as a new subspecies.

*Keywords:* allozymes, asymmetric introgression, *Chioglossa lusitanica*, gene flow golden-striped salamander, hybrid zone, secondary contact, new subspecies

*Manuscript*

## **Introduction**

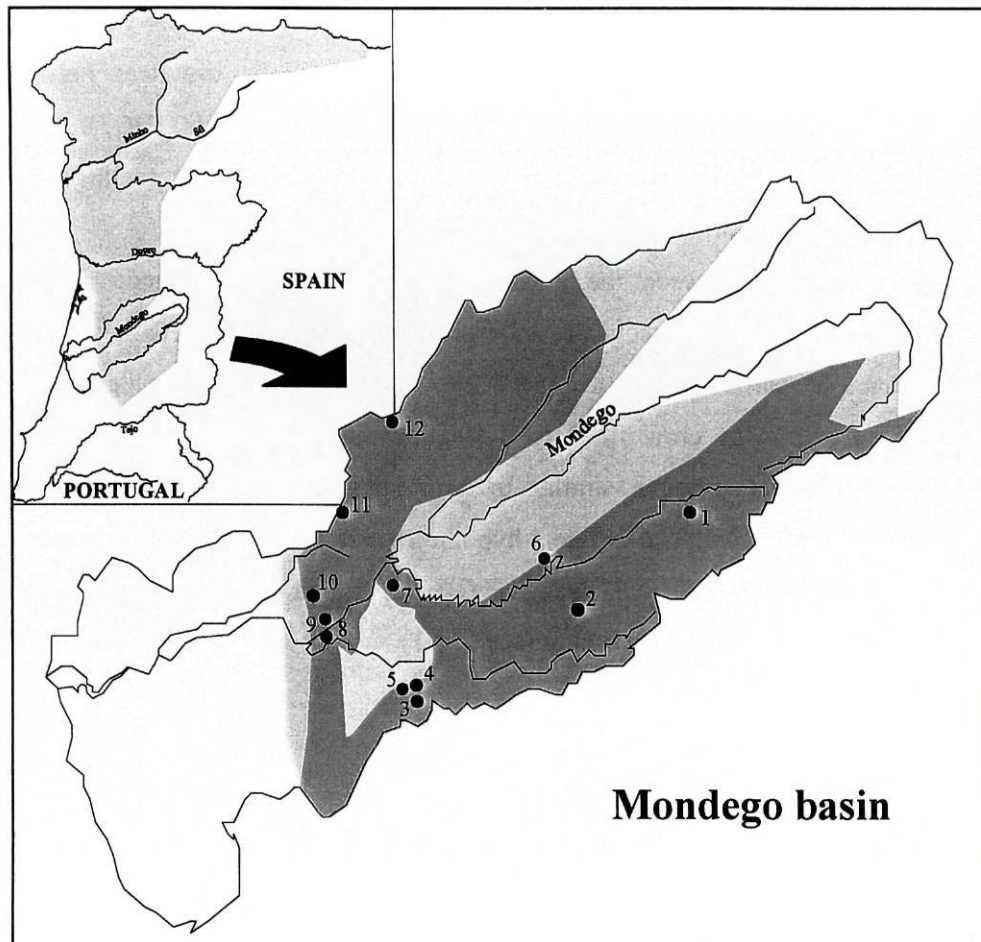
Vicariance processes driven by climate change during the Quaternary affected many organisms, giving rise to genetically diverged populations that often came to meet in zones of secondary contact after climatic amelioration (Hewitt 1996, 1999; Taberlet *et al.* 1998). These are hybrid zones *sensu* Arnold (1997) where genetically distinct groups of individuals meet and mate, resulting in at least some offspring of mixed ancestry. Hybrid zones involve closely related taxa at various levels of speciation and have been referred to as “natural laboratories for evolutionary studies” (Hewitt 1988). Their size and shape is essentially determined by mobility of organisms, levels of reproductive isolation and interactions with the environmental setting where hybridization occurs (Hewitt 1988; Barton & Hewitt 1989; for a review see Arnold 1997).

The golden-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*) is an endemic species restricted to the northwestern corner of the Iberian Peninsula, where it lives around small brooks in fairly mountainous areas. Analysis of allozyme and mitochondrial DNA variation uncovered two genetically distinct groups of populations that are distributed at either side of the Mondego river in central Portugal (Alexandrino *et al.* 2000). The southern group 1 and the northern group 2 also differ morphologically (Alexandrino *et al.* submitted). The groups represent lineages that separated in the early Pleistocene, probably as a result of climate change in combination with local environmental conditions. The pattern of genetic variation observed across the Mondego suggested the existence of a contact zone with limited introgression taking place. Biogeographical modelling indicates that the groups are currently separated by a zone of unfavourable habitat and that ranges are only contiguous in the central part of the Mondego river basin (Teixeira 1999; Fig. 1). We here document the extent and nature of genetic interactions between the southern and northern groups.

## **Material and methods**

Salamanders were collected from 12 localities in and around the presumed contact zone (Fig. 1). Sample processing, electrophoresis and staining procedures of seven

polymorphic enzymes (alcohol dehydrogenase - ADH; phosphogluconate dehydrogenase - PGD; phosphoglucomutase - PGM-1 and four peptidases - PEP-A, PEP-B, PEP-C and PEP-D) followed Alexandrino *et al.* (1997, 2000).



**Figure 1** – Mondego river with study localities of *Chioglossa lusitanica*: 1, Valezim; 2, Açor, Margaraça; 3, Lousã, Castanheira de Pêra; 4, Lousã, Vilarinho; 5, Lousã, Póvoa de Fiscal; 6, Barril do Alva; 7, Riba de Cima; 8, Torres do Mondego; 9, Misarela; 10, Várzeas; 11, Buçaco; 12, Linhar de Pala. Areas of medium and high habitat suitability as identified by bioclimatic modelling (from Teixeira 1999) are shown by light and dark shading, respectively. A full distribution map is shown in the insert (from Arntzen 1999). Note that Buçaco and Açor are the type localities for the nominate and newly described subspecies of *C. lusitanica*, respectively.

Allele frequencies were determined by direct gene counting. Private alleles were defined as those observed in a single population. Genetic Data Analysis software (Lewis & Zaykin 1999) was used to i) calculate the average number of

alleles (A) and average expected heterozygosity ( $H_e$ ), ii) test for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (by exact probability tests following Fisher's method in a Markov-chain procedure), and iii) assess linkage equilibrium between pairs of diagnostic loci (with exact tests and for loci in populations showing intermediate allele frequencies only). Hierarchical cluster analysis of populations was carried out with Cavalli-Sforza & Edwards (1967) chord genetic distances between populations (UPGMA-method with PHYLIP 3.5, Felsenstein 1993). Non-hierarchical cluster analysis was done by multidimensional scaling with STATISTICA (StatSoft 1993).

Associations between the dependent variable genetic distance and the independent variables ecological and geographic distance were tested for significance by partial Mantel tests (RT 2.0; Manly 1996). Geographic distance was measured 'as the crow flies' on 1:100,000 maps. Ecological distance is a measure of spatial distance similar to geographic distance, but follows the suitability of the habitat. The different hypotheses were: A) the Mondego river is a barrier to dispersal, B) the Mondego valley is a barrier to dispersal with a connection over two mountain ranges (see Fig. 1).

## Results

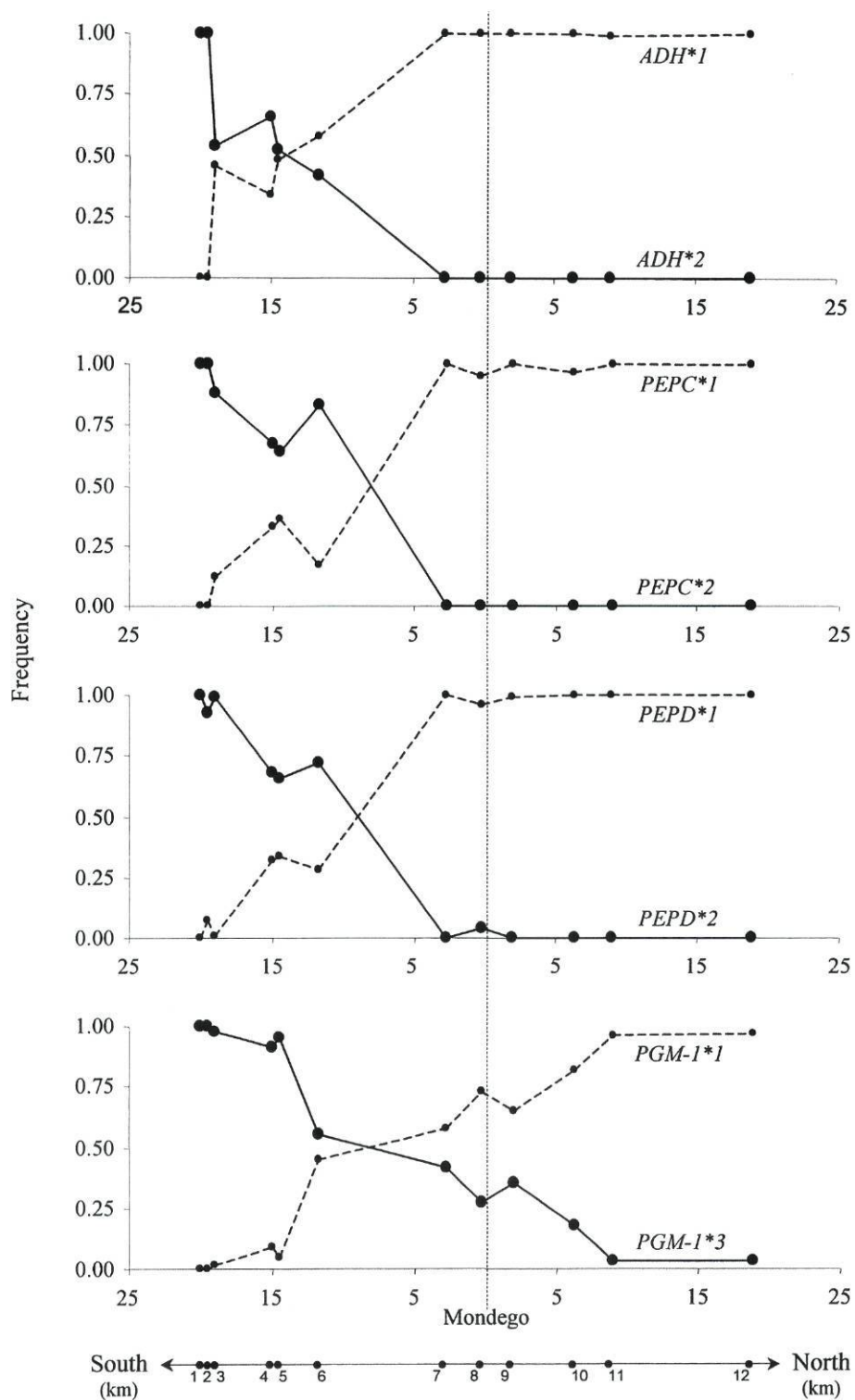
The number of alleles ranged from two at the *PEP-A* and *PGD* loci to six at the *PGM-I* locus (Table 1). The average number of alleles ranged from 1.14 for population 1 to 2.00 for populations 3, 4, 8 and 11. Estimated heterozygosity ranged from <1% in population 1 to >25% in populations 4-6. A marked latitudinal variation was observed in allele frequencies at the loci *ADH*, *PEP-C*, *PEP-D* and *PGM-I*. Populations away from the Mondego (e.g., 1, 2 and 12) showed fixed (or nearly fixed) differences at these loci. Other populations showed intermediate allele frequencies at these loci over a 15-21 km interval (Fig. 2). The clinal variation is steepest over a 10 km interval from populations 6 to 7. Variation across loci was also observed, with change across the contact zone shallower at *PGM-I* than at the other three diagnostic loci (Fig. 2). Genetic variation at the other loci was either minimal (*PEP-A*\*2 in population 11), spatially restricted (*PGD*\*2 in populations 1-5 and *PEP-B*\*2 in populations 7-12) or represented by rare alleles in

both southern and northern groups (*PEP-B\*3* and *PEP-B\*4* in populations 3, 4, 8, 9 and 10).

**Table 1** - Allele frequency, sample size (N), average number of alleles (*A*) and average expected heterozygosity (*He*) at seven polymorphic *loci* in 12 populations of *Chioglossa lusitanica* in the Mondego river basin, Portugal.

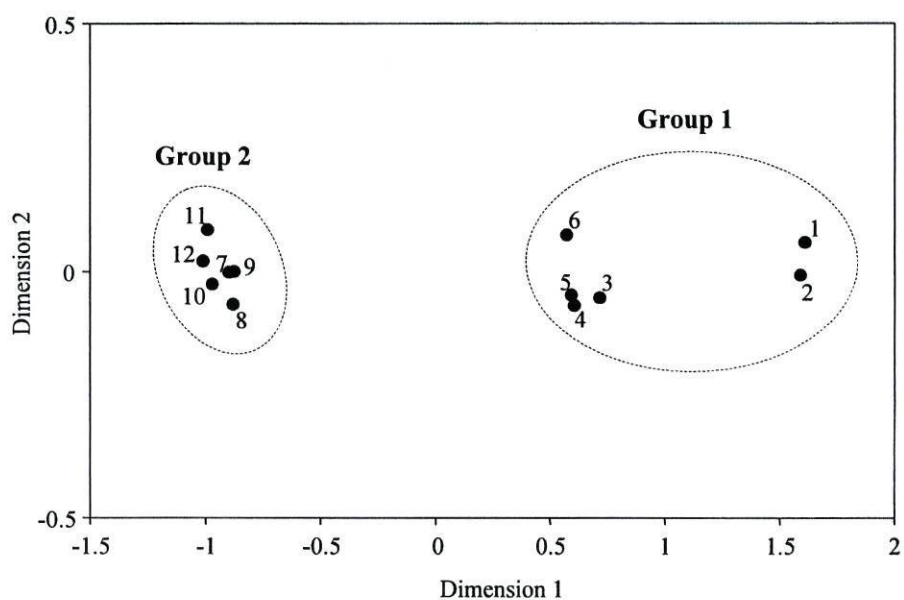
<i>Locus</i>	Allele	Populations											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<i>N</i>	11	33	36	31	28	26	30	14	39	25	47	40
<i>ADH</i>	1	-	-	0.46	0.34	0.48	0.58	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00
	2	1.00	1.00	0.54	0.66	0.52	0.42	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-
	<i>N</i>	15	21	26	28	28	26	42	15	43	24	26	43
<i>PEPA</i>	1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.90	1.00
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-
	<i>N</i>	12	33	79	31	27	24	27	14	39	21	48	29
<i>PEPB</i>	1	1.00	1.00	0.99	0.98	1.00	1.00	0.78	0.68	0.74	0.55	0.51	0.38
	2	-	-	-	-	-	-	0.22	0.21	0.24	0.43	0.49	0.62
	3	-	-	0.01	-	-	-	-	-	0.01	0.02	-	-
	4	-	-	-	0.02	-	-	-	0.11	-	-	-	-
	<i>N</i>	10	13	25	20	21	12	18	11	14	17	17	14
<i>PEPC</i>	1	-	-	0.12	0.33	0.36	0.17	1.00	0.95	0.97	0.97	1.00	1.00
	2	1.00	1.00	0.88	0.67	0.64	0.83	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	0.05	0.03	0.03	-	-
	<i>N</i>	15	31	83	34	28	25	42	14	43	27	47	43
<i>PEPD</i>	1	-	0.07	0.01	0.32	0.34	0.28	1.00	0.96	0.99	1.00	1.00	1.00
	2	1.00	0.93	0.99	0.68	0.66	0.72	-	0.04	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-	-	-
	<i>N</i>	15	21	26	23	28	27	42	15	43	24	29	43
<i>PGD</i>	1	0.97	0.90	0.94	0.93	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	2	0.03	0.10	0.06	0.07	0.05	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N</i>	9	33	83	44	28	19	42	15	40	25	47	37
<i>PGMI</i>	1F	-	-	0.02	0.09	0.05	0.37	0.49	0.66	0.62	0.82	0.84	0.89
	1S	-	-	-	-	-	0.08	0.09	0.07	0.03	-	0.12	0.08
	3F	1.00	1.00	0.94	0.73	0.84	0.55	0.36	0.20	0.32	0.18	0.01	-
	3S	-	-	0.04	0.18	0.11	-	0.06	0.07	0.03	-	-	0.03
	3V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-
<i>A</i>		1.14	1.29	2.00	2.00	1.86	1.71	1.57	2.00	1.86	1.57	2.00	1.43
<i>H<sub>E</sub></i>		0.008	0.042	0.140	0.273	0.261	0.252	0.140	0.169	0.132	0.124	0.143	0.097

Other rare and private alleles were *PEP-C\*3* in populations 8-10, *PEP-D\*4* in population 9 and *ADH\*3*, *PGM-1\*3V* and *PGM-1\*4* in population 11.



**Figure 2** – Frequency of marker alleles at four diagnostic allozyme loci in *Chioglossa lusitanica* in the Mondego river area. Population numbers and distances from the Mondego (x=0) are shown on the horizontal axis.

Statistically significant deviations from expected Hardy-Weinberg equilibrium were not observed. Similarly, genotypic disequilibria did not show significant departures from expectations.



**Figure 3** – Bivariate scatterplot of scores obtained by multidimensional scaling of enzyme genetic distances for 12 populations of *Chioglossa lusitanica*. Note that the axes have different scales. The superimposed ellipsoid contours represent UPGMA-groupings.

Visual inspection of the bivariate scatterplot derived by multidimensional scaling revealed three clusters composed of populations 1 and 2, populations 3-6 and populations 7-12 (Fig. 3). Hierarchical clustering by the UPGMA-method supported two major groups consisting of populations 1-6 and populations 7-12 with significant bootstrap support (results not shown).

Geographical distance and ecological distance (both in terms of the Mondego river - hypothesis A - and the Mondego river valley with a connection over two mountain ranges - hypothesis B) were significantly associated with genetic distances. A partial Mantel test supported hypothesis B over hypothesis A and geographical distance.

**Table 2** – Mantel test and partial Mantel test for association between dependent variable genetic distance over 12 *Chioglossa lusitanica* populations and various independent variables (see text for details).

Causal hypothesis	Genetic distance	
	Mantel test	Partial Mantel test
Geographic distance	***	ns
Ecological distance		
a) Mondego river	**	ns
b) Mondego valley, with dispersal facilitated over mountain ranges	***	***

ns - not significant, \*\*\* -  $p < 0.001$

## Discussion

Genetic variation in populations of *Chioglossa lusitanica* over the secondary contact zone between southern group 1 and northern group 2 revealed a geographic pattern of intergradation at four diagnostic allozyme loci, suggesting hybridization and introgression between the groups. No population, however, showed intermediate allele frequencies (i.e.  $0.20 < \text{frequency} < 0.80$ ) at all diagnostic loci. Each population could unequivocally be allocated either to group 1 or to group 2, a result to which all seven loci contributed with the exception of the essentially uninformative *PEP-A*. Introgression to the south showed similar patterns at diagnostic loci with northern allele frequency generally decreasing to null values at the Açor mountains (population 2). To the north, southern alleles penetrated up until the Buçaco mountains at *PGM-1* but were not observed north of the Mondego valley at the other three diagnostic loci, *ADH*, *PEP-C* and *PEP-D* (Fig. 2). The pattern of genetic variation at *PGM-1* resembles that of the mtDNA cytochrome b locus, but with the southern mtDNA lineage being fixed in northern populations adjacent to the Mondego river and penetrating up north until the Buçaco mountains (Alexandrino *et al.* submitted). This suggests an asymmetrical pattern of introgression not only between nuclear enzyme loci but also between nuclear and cytoplasmic loci.

Genetic differentiation across the hybrid zone was associated to geographic distance combined with a geographic barrier consisting of the Mondego valley. In combination with observed patterns of intergradation and the absence of linkage disequilibrium, this suggests that populations are freely admixing but with introgression restricted by a zone of unfavourable habitat.

#### *Biogeographical implications*

The Mondego valley is the only area where the present range of *C. lusitanica* is constricted along a longitudinal axis nearly separating a southern and a northern species range (Fig. 1; Teixeira 1999). Allozyme and mtDNA variation over the whole species range suggested that this zone has been instrumental in the Quaternary evolution of this salamander (Alexandrino *et al.* 2000, submitted). During unfavourable Pleistocene climatic conditions the Mondego valley, and perhaps the Mondego river itself, triggered a south to north separation of populations over time generating the substantial genetic divergence of the groups. After climatic amelioration, contact between southern and northern populations would have been facilitated by two mountainous corridors running perpendicular to the valley and providing favourable habitat, giving rise to the pattern of isolation-by-distance with restricted gene flow here documented. The discordant pattern of introgression for nuclear loci amongst themselves and compared with the mtDNA locus may have originated from relatively unrestricted gene flow across the valley during more mesic periods. In the absence of selection against hybrids, recombination and backcrossing could have broken up parental gene complexes and allow genes to independently move through the hybrid zone (Hewitt 1993). The geographic patterns of intergradation between the groups could have been further complicated by repeated isolation and secondary contact following the climatic cycles of the Pleistocene.

Populations 7 and 8 are located south of the Mondego river but north of the longitudinal range constriction that follows the Mondego valley. The observation that they belong to the northern group indicates that genetic differentiation is associated with the valley and not with the river, an interpretation that is statistically supported by the partial Mantel test. This argues against the river

Mondego river constituting a major physical barrier to dispersal in *C. lusitanica*. Indeed, large rivers as the Douro and the Minho, though acting as impediments to dispersal, have not prevented the post-glacial colonization of northern Iberia by *C. lusitanica* (Alexandrino *et al.* 2000).

*Perspectives for further research*

The intergradation between two well-differentiated groups of *C. lusitanica* suggests the absence of barriers to gene flow. However, gene flow appears to have been restricted due to a zone of low salamander density. Genetic variation now observed may be the result of post-glacial but not present population dynamics. We propose that more recent gene flow across the contact zone should be investigated through a fine-scale study using highly variable markers such as microsatellites. More detailed population survey within the area and fine-scale habitat modelling would adequately predict favourable/unfavourable habitat, and levels of gene flow to be tested by genetic data. The information on how the contact between diverged groups of *C. lusitanica* is presently established could help decide how these two units of *C. lusitanica* should be managed for conservation.

*Taxonomic implications and description of a new subspecies*

The genetic differentiation between group 1 and group 2 populations amounts to DNei 0.15 for protein loci and to 2% for the average mtDNA cytochrome b gene sequence divergence. Following a molecular clock argument and calibrations for allozymes and cytochrome b in the Salamandridae such divergence corresponds to 3-1.5 MY of lineage independence (Alexandrino *et al.* 2000). Interestingly, both the cross-range clinal genetic variation (Alexandrino *et al.* 2000) and the stepped cline in central Portugal are paralleled by morphological variation in limb and digit length (Alexandrino *et al.* submitted). In view of the inferred long-term independent evolutionary history of the groups and the marked and consistent genetic and morphological differentiation between them, the groups deserve formal taxonomic recognition. We have found no evidence for barriers against gene exchange between the southern and northern groups and conclude that they have

not attained species status under the biological species concept. We hence recognize them as taxa at the subspecies level.

The type locality of *C. lusitanica* is in the Buçaco mountains, here represented by population 11. This poses a problem because Buçaco is located in or close to the contact zone, depending on the characters considered. Following mtDNA data the identity of the Buçaco population is ambiguous because both northern and southern mtDNA types are found locally (Alexandrino *et al.*, 2000). Allozyme and morphological data indicate unambiguously that the Buçaco population belongs to the northern taxon (Alexandrino *et al.*, submitted and present paper). Considering that mtDNA represents a single locus and is known to readily deviate due to its mode of inheritance, the type locality Buçaco therefore represents the northern taxon, i.e., the nominative *Chioglossa lusitanica lusitanica*. The southern taxon we describe as follows.

*C. l. brevitarsis* n. ssp. The holotype is an adult male of 140.0 mm total length, 45.6 mm body length and 94.4 mm tail length. Head length 11.2 mm, head width 7.1 mm, forelimb length 12.3 mm, third finger length 2.3 mm, hind limb length 13.7 mm and length of the fourth toe 2.9 mm. Dorsal side dark brown with two copper-coloured stripes that merge over the pelvic region and continue as a single stripe over the tail. Underside brown-black with scattered blue-grey punctuations. Type locality is Mata da Margaraça in the Açor Mountains. Leg.: J. Alexandrino, June 2000. The type specimen is deposited in Lissabon # etc.

*Description of paratypes.* Description of paratypes. The material is deposited in Lisbon under number xxx and in Amsterdam under ZMA

*Derivatio nominis* - The name of the newly recognized subspecies refers to its characteristically short digits.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by the ‘Instituto da Conservação da Natureza’ (ICN), the ‘LIFE’ program of the European Community and the ‘Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica’ (PRAXIS XXI/BD/5917/95 PhD grant to

JA). Licensing was provided by ICN for Portugal. We thank M. Azevedo for technical assistance.

## References

- Alexandrino J, Froufe E, Arntzen JW, Ferrand N (2000) Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology*, **9**, 771-781.
- Alexandrino J, Ferrand N, Arntzen JW. Morphological variation in two genetically distinct groups of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Submitted*.
- Alexandrino J, Ferrand N, Arntzen JW. Nested clade analysis of phylogeographic data in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Submitted*.
- Arnold ML (1997) *Natural hybridization and evolution*. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, New York.
- Arntzen JW (1999a) *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 - Goldstreifensalamander. In: Grossenbacher K, Thiesmeier B (eds) *Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas*. AULA-Verlag, Wiesbaden, pp 301-321.
- Barton NH, Hewitt GM (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, **341**, 497-503.
- Felsenstein J (1993) *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5*. Distributed by the author. Seattle, University of Washington.
- Hewitt GM (1988) Hybrid zones - natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution*, **3**, 158-167.
- Hewitt GM (1993) After the Ice: *parallelus* meets *erythropus* in the Pyrenees. Hybrid zones and the evolutionary process (Harrison RG, ed.). Oxford University Press, New York.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247-276.

- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87-112.
- Lewis PO, Zaykin D (1999) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d12). Distributed at the internet at <http://chee.unm.edu/gda/>.
- Manly BFJ (1996) RT – A program for randomization testing, Version 2.0. Centre for applications of statistics and mathematics (CASM). University of Otago. New Zealand.
- StatSoft (1993) *STATISTICA for Windows, Release 4.5*. StatSoft Inc., Tulsa.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A, Cosson J (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- Teixeira J (1999) *Biogeografia de Salamandra-lusitânica: utilização de Sistemas de Informação Geográfica na modelação da distribuição*. MSc. Thesis. University of Porto, Portugal.

### 3. Diversidade Fenotípica

V Morphological variation in two genetically distinct groups of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela).

J. Alexandrino, N. Ferrand, J.W. Arntzen. *Submetido*.

# **Morphological variation in two genetically distinct groups of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela)**

J. ALEXANDRINO<sup>1,2</sup>, N. FERRAND<sup>1,2</sup> and J. W. ARNTZEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Praça Gomes Teixeira, 4050 Porto, Portugal; <sup>2</sup>Centro de Estudos de Ciência Animal, ICETA, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte, Crasto, Vairão, 4480 Vila do Conde.

## **Abstract**

**Morphometric and colour pattern variation in the endemic Iberian salamander *Chioglossa lusitanica* is concordant with genetic differentiation between groups of populations separated by the Mondego river in Portugal. Southern salamanders have shorter digits than those from the north. Clinal variation with increasing limb length, toe- and finger length was found superimposed on this dichotomy, resulting in stepped clines for each of the characters describing appendage size. Genetic variation was paralleled by colour pattern variability in the group 1-2 secondary contact zone and in group 2 populations. We invoke historical processes of vicariant isolation, admixture in a secondary contact zone and genetic drift associated to population bottlenecking to explain the observed parallels. Morphological constraints resulting from a highly specialized niche may explain why genetic subdivision of *C. lusitanica* is not matched by a pronounced morphological differentiation.**

*Keywords:* Amphibia, *Chioglossa lusitanica*, clinal variation, colour pattern, golden-striped salamander, morphometrics.

*Submitted to Journal of Zoology*

## **Introduction**

The discovery of genetically differentiated groups of populations within recognized species raises the question of how influential genetic isolation has been in generating phenotypic diversity. Morphological traits are controlled by both genetics and environment and, from an evolutionary perspective, it is important to determine whether morphological differentiation reflects local adaptation or phylogenetic relationships. Parallel variation for different traits, e.g., genetics and morphology, would strengthen conclusions obtained from a single data set. Parallels are expected to result from differentiation but not necessarily from adaptation. One way of testing hypotheses on the extent and nature of phenotypic diversity has been the statistical analysis of morphometric data. This approach is useful in organisms such as urodeles where differentiation often goes unnoticed (Larson, 1984; Good & Wake, 1992; García-París *et al.*, 1998).

The golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* Bocage 1864, is a streamside species inhabiting low and medium elevation mountainous areas in north-western Iberia (Fig. 1). Alexandrino *et al.* (1997, 2000) analyzed allozyme and mitochondrial DNA variation and uncovered two genetically distinct groups of populations that were geographically separated by the river Mondego in central Portugal (group 1 south of the river and group 2 north of the river). The two groups represent lineages that separated in the early Pleistocene, probably as a result of climate change in combination with local environmental conditions. The two groups formed a secondary contact zone in postglacial times. The northern part of the present range was colonized from a refugium south of the river Douro and major rivers such as the Douro and the Minho acted as barriers to dispersal, lowering genetic diversity through sequential bottlenecks.

We here describe morphological variation within *C. lusitanica*. We test morphometric and colouration pattern variation across its range against causal hypotheses of i) isolation by distance and ii) vicariance of groups 1 and 2. Trait variability is examined against causal hypothesis of i) hybrid origin of populations, ii) genetic heterozygosity and iii) geographic distance between populations. Specifically we address the following questions: Is morphological variation

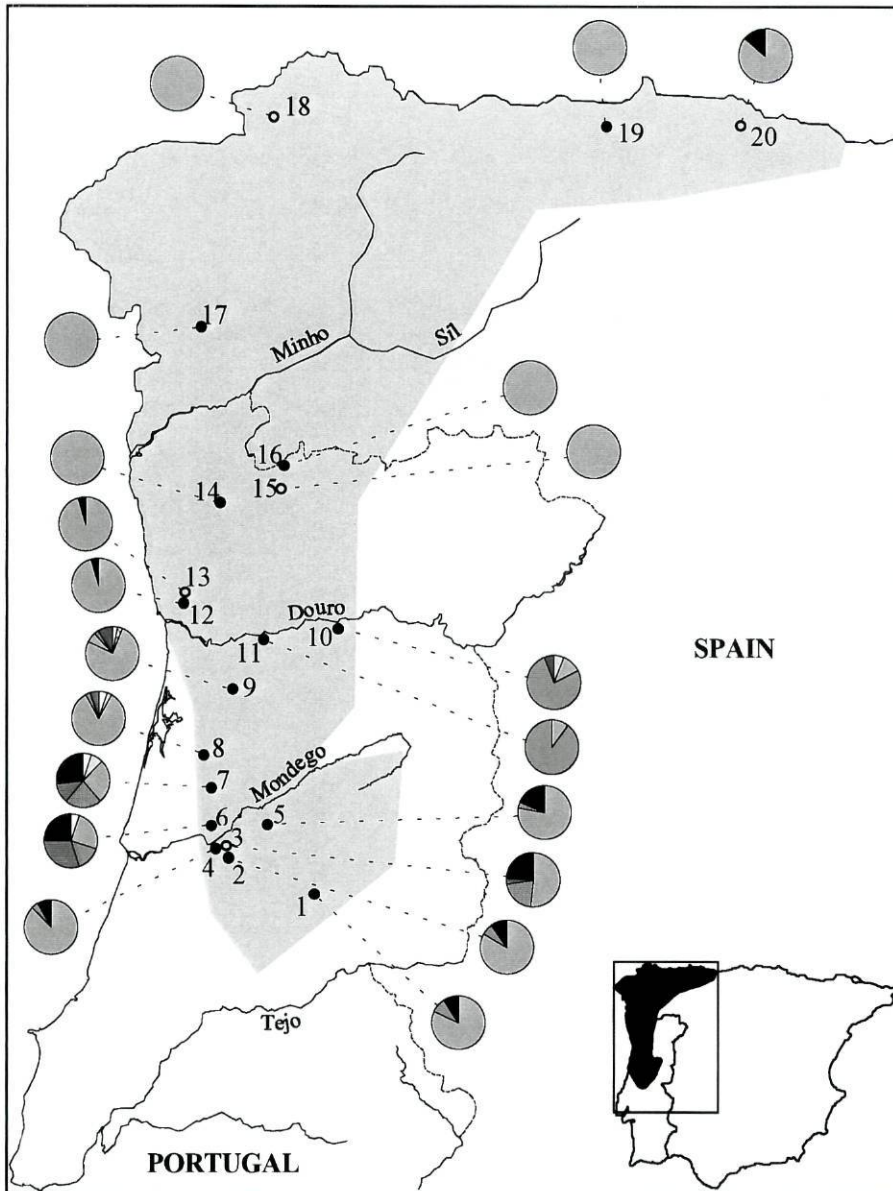
associated with hypothesized glacial refugia? Is genetic differentiation paralleled by morphological change?

### Material and methods

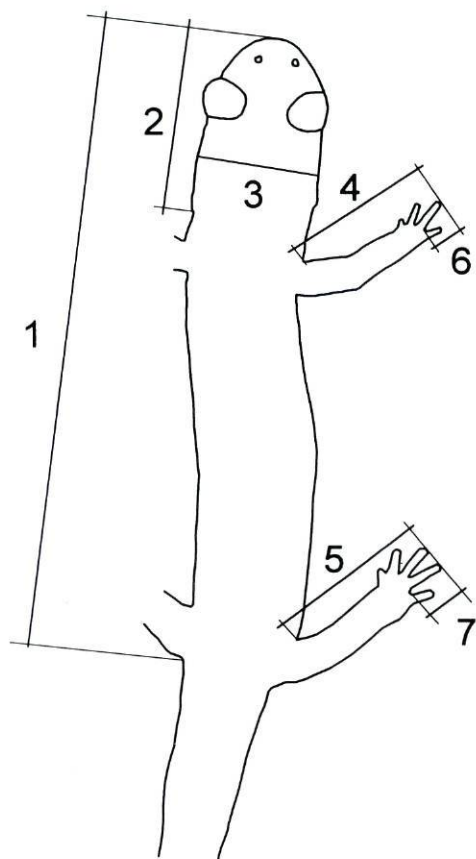
A total of 420 adult *Chioglossa lusitanica* were collected from 20 localities (Fig. 1). Sample sizes ranged from 7 to 51. For each individual the dorsal colouration pattern was classified relative to the typical pattern as follows: type 1, coloured patches absent i.e., melanic; type 2, few coloured patches arranged into incomplete stripes; type 3, two uninterrupted coloured stripes, separated by a dark area of approximately the same width (typical pattern); type 4, stripes wide; type 5, central area with coloured patches diffusely distributed; and type 6, central area with coloured patches in a complex pattern. Seven morphometric measurements were taken on 275 individuals representing all populations except nos. 14 and 17: snout-vent length (SVL), head (snout-gular) length (HL), head width (HW), forelimb length (FLL), hindlimb length (HLL), third finger length (TFL) and fourth toe length (FTL) (Fig. 2). Measurements were taken to the nearest 0.1 mm using digital calipers. Data were collected by J.A. on animals anaesthetized with MS-222.

Morphometric data were log-transformed prior to statistical analysis to reduce deviations from normality and distortion effects caused by allometric relationships. Population means were compared by multivariate analysis of variance with the variable “sex” nested under the variable “locality”. All measurements showed significant differences between populations and HL, FLL and TL showed significant differences between sexes. Subsequent morphometric analyses were performed for males and females separately. Following confirmation by principal component analysis (PCA) that size explained most of the observed variability, the residuals of the regression of log<character> against logSVL were used. Analyses were performed with the software package Statistica/w 4.5 (StatSoft, 1993). Trend surface maps were generated by kriging under default settings in Surfer 6.0 (Golden Software, 1996) geostatistical software. The dependent variables colour pattern (with sexes pooled), six morphometric variables (HL, HW, FLL, HLL, TFL and FTL) and mean factor scores on the first and

second PCA axis were tested for association with causal hypotheses by partial Mantel tests (RT 2.0; Manly, 1996).



**Figure 1** – The distribution of *Chioglossa lusitanica* in the northwestern Iberian Peninsula (shaded area, from Arntzen, 1999) and the study localities: 1, Muradal, Foz de Giraldo (MU); 2, Lousã, C. Pêra (LCP); 3, Lousã, Fiscal (LFI); 4, Lousã, Vilarinho (LVI); 5, Açor, Margaraça (AC); 6, Várzeas (VA); 7, Buçaco (BU); 8, Saide (SA); 9, Covelo (C); 10, Tarouca (T); 11, Montemuro (M); 12, Valongo, Silveirinha (VSI); 13, Valongo, Águas Férreas (VAF); 14, Bom Jesus (B); 15, Cabreira (CA); 16, Gerês (G); 17, Pontevedra (PO); 18, Caaveiro (CAV); 19, Salas (SAL); 20, Cuera (CU). Solid dots denote populations for which genetic data are available (Alexandrino *et. al.*, 2000). Pie diagrams represent colour pattern classes: □ -1, □ -2, □ -3, □ -4, □ -5, □ -6.



**Figure 2** - Morphometric measurements taken in 18 populations of *Chioglossa lusitanica*: (1) SVL, snout-vent length; (2) HL, head (snout-gular) length; (3) HW, head width; (4) FLL, forelimb length; (5) HLL, hindlimb length; (6) TFL, third finger length; (7) FTL, fourth toe length.

Morphological differentiation was expressed by pairwise euclidean distances for population means for all dependent variables, and tested against the independent variables geographic distance (measured on 1:100,000 maps) and group membership. Similarly, morphological variability was expressed by distances calculated from the variance for the PCA axes and coefficient of variation for colour pattern, and tested with expected heterozygosity (Alexandrino *et. al.*, 2000; Alexandrino, unpublished) and hybridity as independent variables geographic distance. Hybridity distinguished between populations located within and outside the putative secondary contact zone between group 1 and group 2 (populations nos. 3, 4, 6 and 7; Alexandrino *et. al.*, 2000).

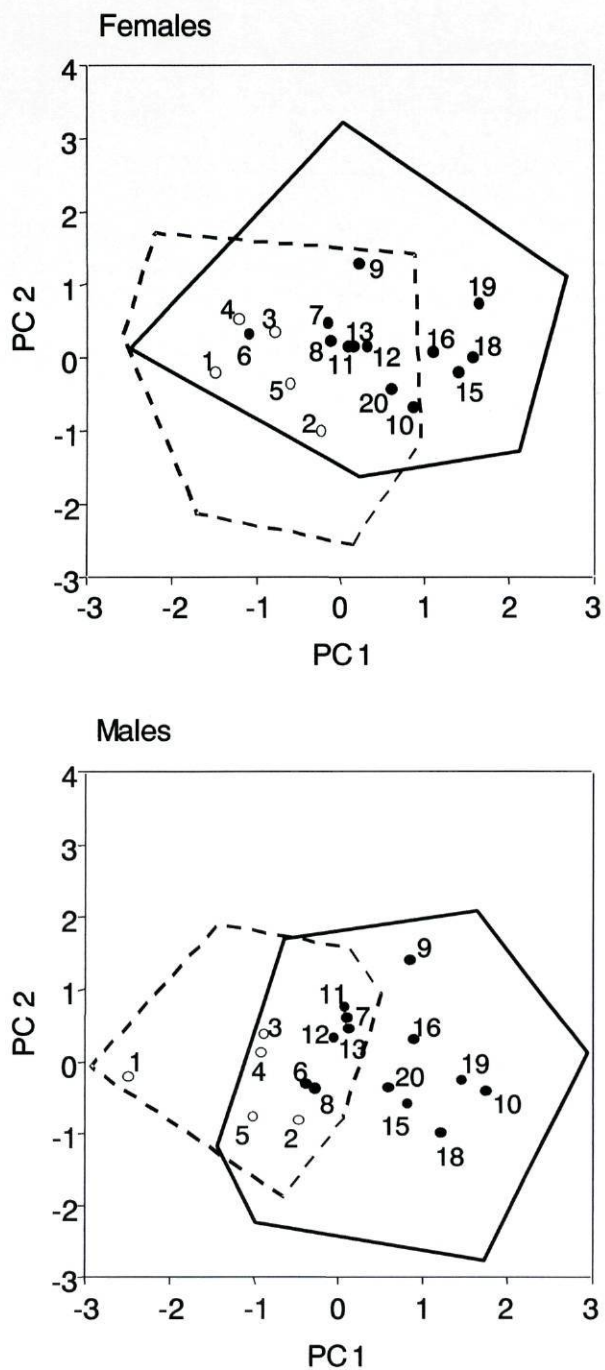
## Results

*Morphometrics.* The first and the second PCA axes explained, respectively, ca. 47% and ca. 20% of the variance, for both males and females (Table 1). The first PCA axis had high character loadings of the limb and digit variables (0.76 to 0.89) and the second PCA axis had high character loadings of head length and head width (0.54 to 0.84). In other words, variation observed for extremities and for head shape was largely independent. Mean population factor scores for the first PCA axis increased from south to north, reflecting an increase in relative limb and digit size (Figs. 3 and 4). Mean population factor scores for the second PCA axis did not show any readily interpretable geographic pattern (Fig. 3).

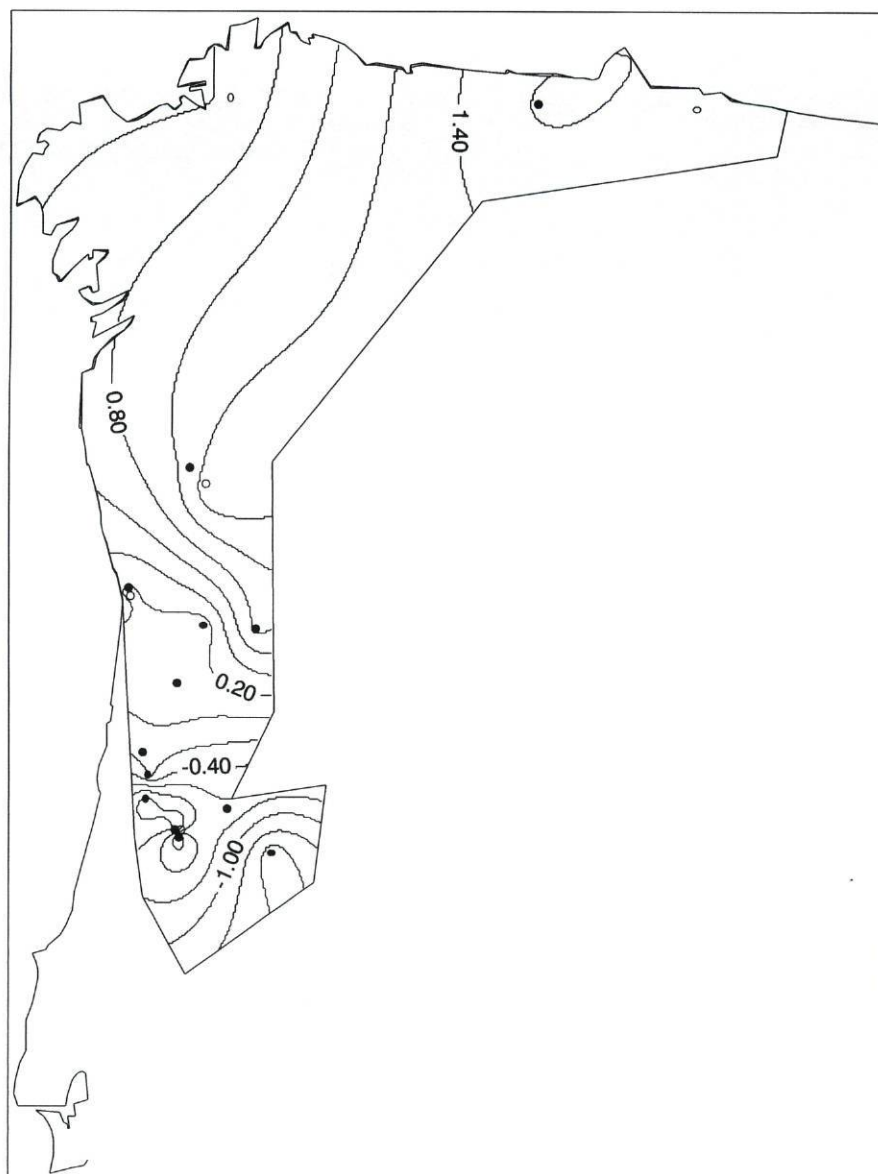
**Table 1** - Factor loadings for the first and second Principal Components axis for six morphometric measurements taken in 18 populations of *Chioglossa lusitanica*.

Variables	Females		Males	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Head length (HL)	0.195	0.710	0.483	0.536
Head width (HW)	0.157	0.800	0.158	0.841
Forelimb length (FLL)	0.762	-0.193	0.800	-0.248
Hindlimb length (HLL)	0.845	-0.109	0.803	-0.331
Third finger length (TFL)	0.834	0.008	0.772	-0.102
Fourth toe length (FTL)	0.885	-0.038	0.805	0.007
Variance explained	47.3%	20.2%	46.5%	19.6%

*Colour pattern.* Colour pattern type 3 was the most common in all examined populations except for populations 10 and 11 where type 4 was most frequent (Fig. 1). Type 4 was present in all populations south of the Douro River. Other patterns were present in some of those populations and not in others. Pattern types other than type 3 were absent north of the Douro, with the exception of pattern type 5 that was present, at low frequency, in populations 12, 13 and 20.



**Figure 3** – First two axes from PCA of six size adjusted morphometric variables in 18 populations of *Chioglossa lusitanica*. Population centroids and minimum convex polygons enclosing individual factor scores for group 1 and group 2 populations. Open dots and dashed lines represent southern ‘group 1’ populations; solid dots and uninterrupted lines represent northern ‘group 2’ populations.



**Figure 4** - Trend surface map generated by the kriging of mean factor scores of the first Principal Component axis of 18 populations of female *Chioglossa lusitanica*.

*Testing causal hypotheses.* Scores on the first PCA axis were associated with both geographic distance and group membership. Scores on the second PCA axis were not associated with any of the independent variables (Table 2A). In females, head length and head width were associated with geographic distance and group membership, respectively (Table 2B). Length of the extremities was associated with geographical distance, with the exception of FLL in males. Digit length and

HLL in males were also associated with group membership. Colour pattern was associated to neither geographic distance or group membership. The variance for the first and second PCA axes was not associated with any of causal hypotheses in either females and males.

**Table 2** – Partial Mantel test results for association between morphological differentiation across 18 populations of *Chioglossa lusitanica* versus geographic distance and group membership (see text for details). Dependent variables are A) the first two PCA axes and B) individual morphometric variables and colour pattern.

Morphological distance (dependent variable)	Causal hypothesis (independent variables)	
	Geographic distance	Group membership
<b>A)</b>		
PCA 1 (females)	***	**
PCA 1 (males)	*	***
PCA 2 (females)	ns	ns
PCA 2 (males)	ns	ns
<b>B)</b>		
HL (females)	*	ns
HL (males)	ns	ns
HW (females)	ns	**
HW (males)	ns	ns
FLL (females)	***	ns
FLL (males)	ns	ns
HLL (females)	***	ns
HLL (males)	*	*
TFL (both sexes)	*	***
FTL (both sexes)	**	***
Colour pattern	ns	ns

ns - not significant, \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Colour pattern variability was associated with hybridity and not with geographic distance and heterozygosity (Table 3). Additionally, a trend was observed for colour pattern variability to decrease from south to north in group 2 populations (Fig. 1).

**Table 3** – Partial Mantel test results for association between morphological variability across 18 populations of *Chioglossa lusitanica* versus geographic distance, heterozygosity and hybrid versus non-hybrid population status.

Morphological variability distance (dependent variable)	Causal hypothesis (independent variables)		
	Geographic distance	Heterozygosity	Hybridity
PCA1 (females)	ns	ns	ns
PCA1 (males)	ns	ns	ns
PCA2 (females)	ns	ns	ns
PCA2 (males)	ns	ns	ns
Colour pattern	ns	ns	**

ns - not significant, \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

### Discussion

Morphometric variation in the endemic Iberian salamander *Chioglossa lusitanica* was found to be concordant with documented genetic differentiation. Group 1 from south of the Mondego river in Portugal is characterised by shorter digits than is group 2 from north of the Mondego. A pattern of south to north clinal variation with increasing limb length, toe- and finger length was found superimposed on this dichotomy, resulting in stepped clines for each of the characters describing appendage size. We invoke historical, vicariant isolation and selection processes to account for the dichotomy and the observed gradual variation. Short appendages may represent an adaptation to xeric (i.e., less moist) environmental conditions (because of a low volume to surface ratio - Nevo, 1972; Lee, 1993). *Chioglossa lusitanica* is extremely dependent on moist habitats and the level of annual precipitation is the main predictor of its range in Portugal (Teixeira & Arntzen, submitted). Assuming that past rainfall gradients parallel that of today, selection could have produced the documented (stepped) clines. The puzzling question however remains why under vicariant isolation selection would operate on digits only and under isolation by distance on the entire appendages.

Colour pattern nor colour pattern variability was associated with group membership or with geographic distances between populations. However, colour pattern variability was higher in the group 1-2 contact zone than elsewhere,

suggesting that the mixing of differentiated gene pools increased phenotypical variability. Two more parallels between morphology and genetic diversity were found in group 2 populations. Firstly, group 2 populations are characterised by a decrease in genetic and colour pattern variability from south to north. The processes of sequential bottlenecking and drift invoked to explain the decrease in genetic variation are equally applicable to morphological variation. Secondly, the dominance of the otherwise rare colour pattern 4 south of the Douro (populations 10 and 11) may reflect a separate Pleistocene refugium in this area, as was suggested by the local presence of private nuclear and mtDNA alleles (Alexandrino *et. al.*, 2000). These morphological – genetic parallels are surprising considering that the cryptic coloration pattern of *C. lusitanica* is likely to be under strong selection, whereas protein genetic diversity is not (but see Karl & Avise, 1992). Morphometric and colour pattern variation was also observed by Vences (1990), but with only three samples from south of the river Minho robust spatial patterns could not be discerned.

The genetic subdivision of *C. lusitanica* is not matched by an equally pronounced morphological differentiation. Cryptic differentiation and clines appear common phenomena in amphibians (Larson, 1984; Good & Wake, 1992; Green *et al.*, 1996, Carlin, 1997; Tarkhnishvili *et. al.*, 2000). The remarkable evolutionary convergence between streamside salamanders such as *C. lusitanica* and a phylogenetically unrelated species such as *Eurycea longicauda* indicates that constraints may be in place against departures from a highly specialized morphotype.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the ‘Instituto da Conservação da Natureza’ (ICN), the ‘LIFE’ program of the European Community and the ‘Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica’ (PRAXIS XXI / BD / 5917 / 95 PhD grant to J.A.). Licensing was provided by ICN for Portugal and by the Galician and Asturian ‘Junta de Medio Ambiente’ for Spain. We thank E. Froufe, C. Oliveira, F. Sequeira, D. Tarkhnishvili and J. Teixeira for support and discussions.

## References

- Alexandrino, J., Ferrand, N. & Arntzen, J. W. (1997). Genetic variation in some populations of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela), in Portugal. *Biochemical Genetics* **35**: 371-381.
- Alexandrino, J., Froufe, E., Arntzen, J. W., & Ferrand, N. (2000) Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology* **9**: 771-781.
- Arntzen, J. W. (1999). *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 - Goldstreifensalamander. in: Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas. Pp. 301-321. K. Grossenbacher and B. Thiesmeier (Ed.). AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Carlin, J. L. (1997). Genetic and morphological differentiation between *Eurycea longicauda longicauda* and *E. guttolineata* (Caudata: Plethodontidae). *Herpetologica* **53**: 206-217.
- García-París, M., Alcobendas, M. & Alberch, P. (1998). Influence of the Guadalquivir River Basin on mitochondrial DNA evolution of *Salamandra salamandra* (Caudata: Salamandridae) from southern Spain. *Copeia* **1998**: 173-176.
- Good, D. A. & Wake, D. B. (1992). Geographic variation and speciation in the torrent salamanders of the genus *Rhyacotriton* (Caudata: Rhyacotritonidae). *University of California Publications in Zoology* **126**.
- Green, D. M., Sharbel, T. F., Kearsley, J. & Kaiser, H. (1996). Postglacial range fluctuation, genetic subdivision and speciation in the western North American spotted frog complex, *Rana pretiosa*. *Evolution* **50**: 374-390.
- Karl, S. A. & Avise, J. C. (1992). Balancing selection at allozyme loci in oysters: Implications from nuclear RFLPs. *Science* **256**: 100-102.
- Larson, A. (1984). Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae. In: Recht, M. R., Wallace, B. and Prance, G. T. (Ed.) *Evolutionary Biology* **17**: 119-217.

- 
- Lee, J. C. (1993). Geographic variation in size and shape of neotropical frogs: a precipitation gradient analysis. *Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* **163**: 1-20.
- Manly, B. F. J. (1996). *RT-a program for randomization testing, Version 2.0*. Dunedin: Centre for Applications of Statistics and Mathematics, University of Otago.
- Nevo, E. (1972). Climatic adaptation in size of the green-toad, *Bufo viridis*. *Israel Journal of Medical Science* **54**: 1010
- StatSoft (1993). *STATISTICA for Windows, Release 4.5*. StatSoft Inc., Tulsa, USA.
- Golden Software (1996). *Surfer for Windows (Win32): Surface Mapping System, Version 6.04*. Golden Software Inc., Golden, USA.
- Tarkhnishvili, D. N., Thorpe, R. S. & Arntzen, J. W. (2000). Pre-Pleistocene refugia and differentiation between populations of the Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**: 414-422.
- Teixeira, J., Arntzen, J. W. Biogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*: a field survey and spatial modelling approach. *Submitted*.
- Vences, M. (1990). Untersuchungen zur ökologie, ethologie und geographischen variation von *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864. *Salamandra* **26**: 267-297.

## 4. Padrões Biogeográficos e Conservação

**VI** The historical biogeography and conservation of the Golden-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*): Integrating ecological and genetic data.

J. Alexandrino, J. Teixeira, J.W. Arntzen, N. Ferrand. *Em preparação.*

# Historical biogeography and conservation of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*: integrating ecological and genetic data

J. ALEXANDRINO, J. TEIXEIRA, J. W. ARNTZEN and N. FERRAND

*Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Praça Gomes Teixeira, 4050 Porto, Portugal; Centro de Estudos de Ciência Animal, ICETA, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte, Crasto, Vairão, 4480 Vila do Conde, Portugal.*

## Abstract

The Golden-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*) is an endemic streamside species inhabiting mountainous areas in the northwestern Iberian Peninsula. This Salamandrid is considered to be threatened in the IUCN Red List Data Book. The combination of bioclimatic modelling of the species distribution and multivariate analysis of genetic data (allozymes) strengthens previous hypotheses concerning the historical biogeography of *C. lusitanica*: the Pleistocene subdivision of the range of the species and a process of postglacial recolonization. Discrepancies between bioclimatic modelling predictions and the present-day distribution suggest that the species may still be expanding its range northwards. On the basis of integrated information, we propose the identification of two distinct units for the conservation of the species and suggest that this information should be taken into account in defining key areas for conservation in the Iberian Peninsula. We believe that this synthetic approach could be successfully applied to other organisms offering an objective and practical method for the identification of diversity hotspots both within single species and at the community level.

*Keywords:* *Chioglossa lusitanica*, golden-striped salamander, population history

*Submitted to Conservation Genetics*

## **Introduction**

Fluctuations in spatial distribution and abundance are a commonplace to many plant and animal species. In the northern hemisphere the Pleistocene glaciations are a good example of how climate change affected species distributions, by alternately inducing range contractions to the south and range expansions to the north (Hewitt 1996, 1999, 2000). Southern Europe contained glacial refugia where many species survived during glacial periods and represented a centre of origin for postglacial recolonizations. The geographic patterns resulting from these processes vary with e.g. different dispersal ability and ecological requirements of species (Hewitt 1996; Taberlet *et al.* 1998).

Patterns of species distribution and diversity have been represented through plotting presence/absence data on grid systems at various scales. Spatial modelling techniques may predict the distribution of species (Walker 1990; Pereira and Itami 1991; Brito *et al.* 1996) and individuals (Austin *et al.* 1996), or be used to estimate suitable habitat (Mladenoff and Sickley 1998) and for designing conservation plans (Velázquez & Bocco, 1994). One important limitation of these models is that they ignore historical patterns of population persistence.

The geographical distribution of genetic diversity across a species range may be used to reconstruct organismal historical biogeographies (Avice 1994, 1998; Bermingham and Moritz 1998). Multivariate analysis of genetic data may summarize variation at several genes by a few independent synthetic variables that can be represented in geographical maps (Menozzi *et al.* 1978). Such analysis in humans has been used to construct synthetic genetic maps that helped investigating demic expansions and determining centres of origin (Cavalli-Sforza *et al.* 1993, 1994). This approach has been applied extensively to human genetics (Menozzi *et al.* 1978; Piazza *et al.* 1981; Cavalli-Sforza *et al.* 1993, 1994; Bosch *et al.* 1997) but scarcely to other organisms (Guinand & Eastal 1996, Le Corre *et al.* 1998).

The Golden-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*) is an endemic and IUCN Red List Data Book listed species restricted to the northwestern corner of the Iberian Peninsula, where it lives around small brooks in fairly mountainous areas. We recently analyzed allozyme and mitochondrial DNA variation and uncovered two genetically distinct groups of populations that were geographically

separated by the river Mondego in central Portugal (group 1 south of the river and group 2 north of the river; Alexandrino *et al.* 1997, 2000). The two groups represent lineages that separated in the early Pleistocene, probably as a result of climate change in combination with local environmental conditions. A secondary contact zone between the groups was formed postglacially. We further inferred that the northern part of the present range was colonized from a refugium in between the Mondego and the Douro, and that major rivers such as the Douro and the Minho acted as barriers to dispersal, lowering genetic diversity through sequential bottlenecks.

We here combine an ecological model of the distribution of *C. lusitanica* (Teixeira 1999; Teixeira & Arntzen submitted) with synthetic genetic maps constructed from multivariate analysis of allozyme genetic data. Our aims are i) to discuss hypothesized historical biogeographic scenarios, and ii) to propose areas for the long-term conservation of the species based on present habitat suitability and historical population persistence.

## Material and methods

### *The distribution model*

The spatial model used to predict the distribution of *C. lusitanica* was recently constructed from logistic regression of presence/absence data in Portugal against a set of environmental parameters (Teixeira 1999). The probability of occurrence of *C. lusitanica* across the Iberian Peninsula was estimated from the variables total annual precipitation (PRET), slope (SLOP), altitude (ALTI), and mean temperature of July (TJUL) ( $g(x) = -0.087 + 0.131 \times \text{PRET} + 0.063 \times \text{SLOP} - 0.063 \times \text{ALTI} - 0.052 \times \text{TJUL}$ ), with a 93% success rate (Teixeira 1999).

### *Multivariate analysis of genetic data*

*The dataset.* Genetic data consisted of allele frequencies at six polymorphic allozyme loci (PGM1, PEPB, PEPC, PEPD, ADH and PGD) scored from 17 populations distributed across the whole range of *C. lusitanica* (Alexandrino *et al.* 2000).

*Principal Components Analysis (PCA)*. Rare alleles (frequency <0.05) were excluded from the analysis to decrease the effect of sampling error. The most common allele at five nearly diallelic loci (PEPB\*1, PEPC\*1, PEPD\*1, PGD\*1 and ADH\*1) and four out of five alleles at the highly polymorphic PGM1 locus (PGM1\*1F, PGM1\*1S, PGM1\*2 and PGM1\*3F) were used for PCA. Allele frequencies were spatially interpolated by a linear distance weighting model (kriging default) to generate 400 allele frequency values regularly distributed within a grid delimited by parallels 39-44 °N and meridians 4-9 °W, using the Surfer 6.0 geostatistical software (Golden Software 1996). Interpolated allele frequencies for each allele were then used to perform a principal component analysis with the software package Statistica/w 4.5 (StatSoft 1993). The factor scores for the first two principal components (PC) resulting from PCA were used to construct geographical maps with the kriging interpolation procedure in Surfer 6.0 (Golden Software 1996). The two maps were then overlaid using different colours for PC1 and PC2 and weighting for the variance explained by each of the PC's, as suggested by Menozzi *et al.* (1978).

#### *Combination of ecological and genetic data*

We combined the distribution map of *C. lusitanica* according to the spatial model of Teixeira (1999) with the synthetic genetic map (PC1 and PC2 combined) by overlaying the two maps in the GIS software Idrisi for Windows v. 2.0 (Eastman, 1997).

## **Results and discussion**

### *Synthetic genetic maps*

Evidence from nuclear and mitochondrial loci at the endemic salamander *Chioglossa lusitanica* suggested an historical subdivision of the species range in two Pleistocene refugia (Alexandrino *et al.* 2000). It also suggested a process of postglacial recolonization of the northern parts of the species range. Multivariate analysis of allozyme genetic variation explained 70% of the total variation along

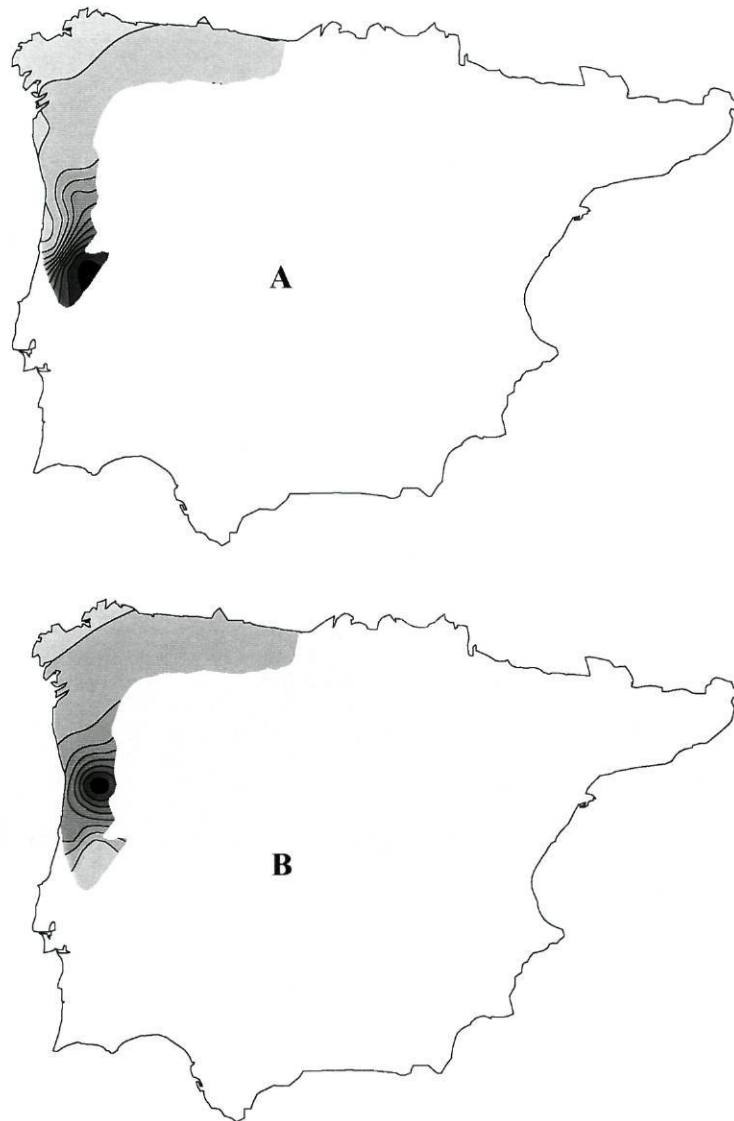
the first axis, showing a south-north genetic differentiation, from Serra do Muradal in central Portugal to Salas in northern Spain (Table 1; Fig. 1A).

**Table 1** - Factor loadings for the first and second Principal Components axis for nine allele frequencies observed at six allozyme loci in 17 populations of *Chioglossa lusitanica* (Alexandrino *et al.* 2000).

Allele	PC 1	PC 2
PGM1*1F	0.88	0.15
PGM1*1S	0.79	0.48
PGM1*2	0.01	-0.96
PGM1*3F	-0.97	0.09
PEPB*1	-0.05	0.96
PEPC*1	0.96	-0.14
PEPD*1	0.97	-0.02
PGD*1	0.94	-0.01
ADH*1	0.98	-0.05
Variance explained	70 %	25 %

The steep geographic gradient along the Mondego valley likely reflects recent secondary contact between two formerly isolated groups (Alexandrino *et al.* 2000). The second axis explained 25% of the total variation and shows a diffusion gradient centered in Serra de Montemuro in northern Portugal (Table 1; Fig. 1B). This pattern suggests a process of expansion from a centre of origin following genetic isolation (Menozzi *et al.* 1978). The area of Montemuro may well correspond to a secondary refugium for this species during Quaternary glaciations (Alexandrino *et al.* 2000) from where the population expanded geographically to the north, in the direction of Spain and occupying most of Galicia and Asturias, but also to the south down to the Mondego valley. The overlay of the first and second PCs, using the red colour for the first PC and the blue colour for the second PC, clearly represents the two differentiated population groups, south and north of the Mondego River (Fig. 2). The geographic pattern depicted for the northern group

combined with the reported genetic uniformity for the populations in the northernmost parts of the species range (Alexandrino *et al.* 2000) suggests a process of recent colonization of these territories from populations south of the Douro River, probably from the Montemuro area.



**Figure 1** - Principal Component Analysis of 9 independent alleles frequencies at the loci PGM1, PEPB, PEPC, PEPD, PGD and ADH in 17 populations of *Chioglossa lusitânica*: A) Synthetic map for the first principal component, representing 70% of the total variation; B) Synthetic map for the second principal component, representing 25% of the total variation;



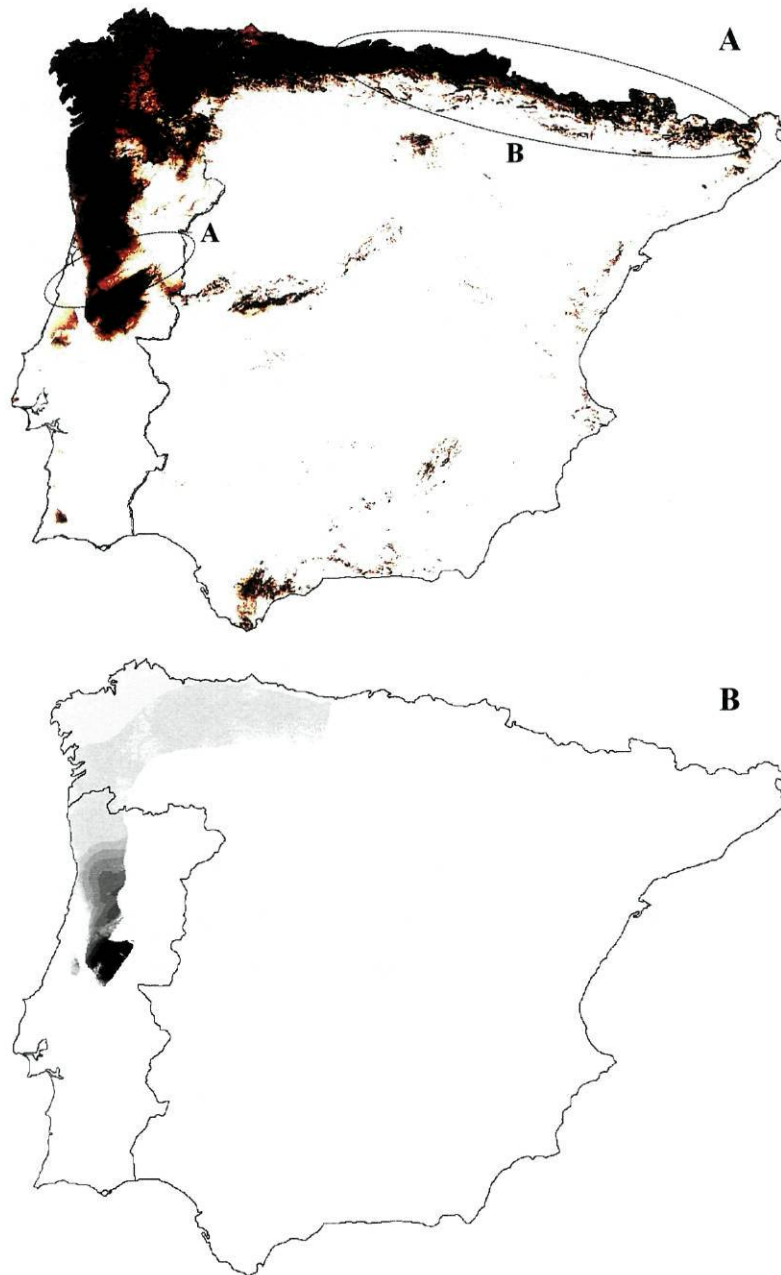
**Figure 2** - Superimposition of maps A and B of figure 1, weighting the variance explained by each of the two PCs. The red colour was used for the first principal component and the blue colour for the second principal component. The two colours correspond to two independently evolving lineages in *Chioglossa lusitanica*.

#### *Insights from ecological modelling*

The predictive model for the distribution of *C. lusitanica* in the Iberian Peninsula (Fig 3A; Teixeira 1999) was important to help reconstructing historical biogeographical scenarios for the species. First, the Mondego valley is associated with a low probability for the occurrence of the species, nearly separating regions located south and north of the river. This strengthens the hypothesis of vicariance along the Mondego Valley because under adverse climatic conditions of the Pleistocene, this area may have contributed to a local south-north fragmentation of populations.

The occurrence of *C. lusitanica* was predicted for several mountainous locations in central and southern Iberia (Fig 3A). The absence of *C. lusitanica* from these areas of apparently suitable habitat may result from historical factors, strict ecological requirements and low dispersal ability, preventing postglacial colonization to the south. It may be worthwhile the comparison with the streamside lizard *Lacerta schreiberi* which is also distributed across the northwestern Iberia but occurs in population isolates in mountainous areas of southern Spain and

Portugal (Brito *et al.* 1998). Bioclimatic modelling applied to *L. schreiberi* (Brito



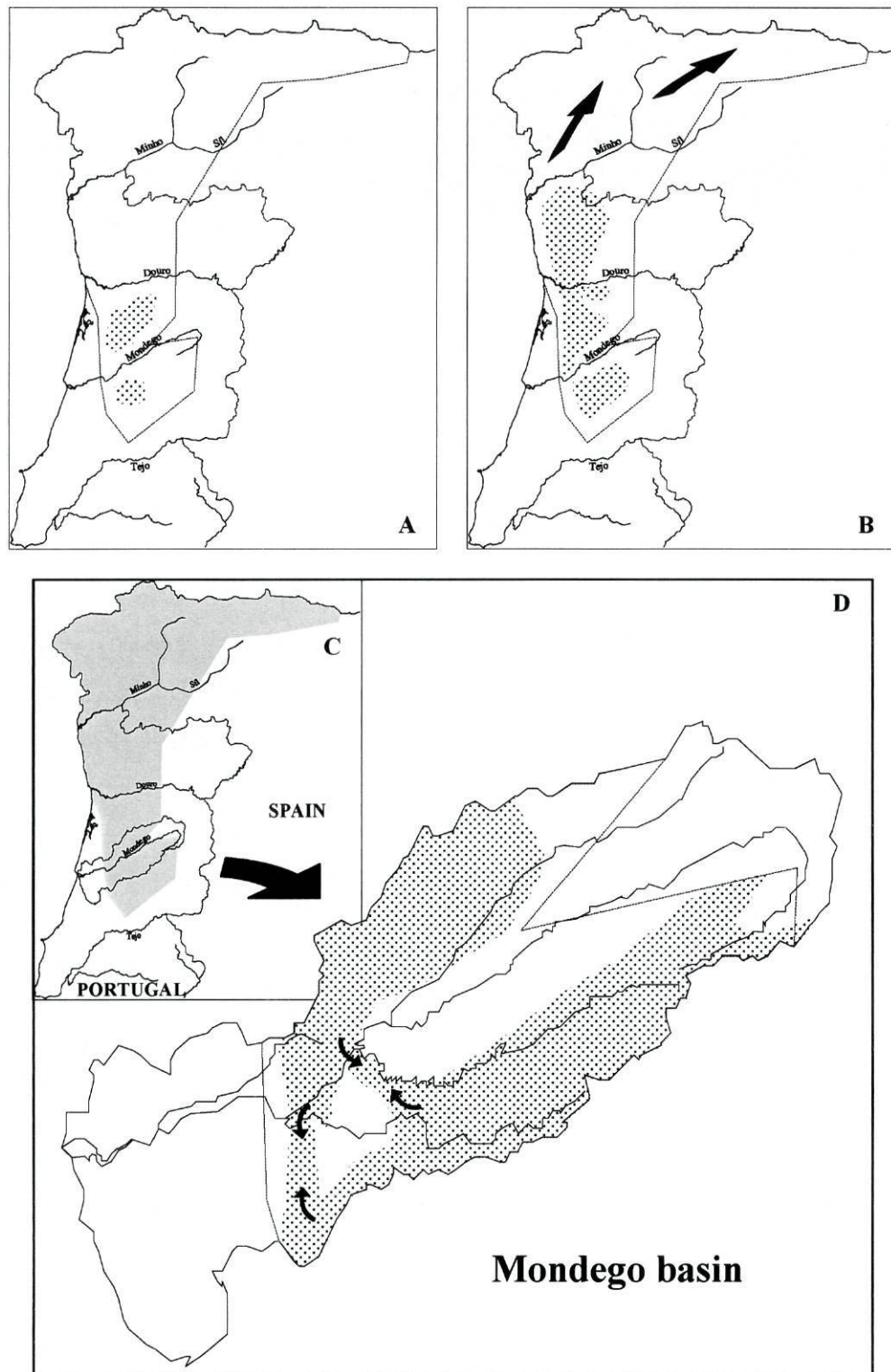
**Figure 3** - A) Predictive distribution map of *Chioglossa lusitanica* in the Iberian Peninsula following the data presented in Teixeira *et al.* (1999). A - Mondego valley; B - northeastern Spain, from eastern Cantabria to the Pyrenees, where *C. lusitanica* does not occur; B) Overlay of the predictive model of the distribution of *C. lusitanica* with the synthetic maps resulting from Principal Components Analysis on allele frequencies.

*et al.* 1996) and the genetic structuring of populations (Godinho *et al.* submitted) suggests that those isolates resulted from fragmentation associated with climate warming since the last glacial maximum. They may be the remains of a past range of *L. schreiberi*, probably more widely distributed than *C. lusitanica* because of less strict ecological requirements and higher dispersal ability.

Another discrepancy between the present-day distribution of *C. lusitanica* and the predictive distribution (Fig. 3A) concerns the territories of northeastern Spain, from eastern Cantabria to the Basque country and the Pyrenees, where the species was not observed but shows a high probability of occurrence. Vences (1997) suggested that soil type may be important in explaining the absence of *C. lusitanica* in northeast of Spain. The effect of an ecological limiting factor cannot be ruled out but the genetic data suggests another explanation: a postglacial expansion that is still occurring. The comparison with *L. schreiberi* may again be helpful. This species occurs along the northeastern region of Spain and meets *L. bilineata* close to the French border, constituting a postglacial contact zone where the parapatric boundaries are maintained by interspecific competition (Barbadillo *et al.* 1999). Indeed, several mechanisms (e.g. interspecific competition, hybridization, reproductive interference, sharing of parasites) contribute to produce numerical disadvantage faced by an individual crossing into the range of the other species, reducing the fitness of pioneering individuals and preventing range interpenetration (Barton & Hewitt 1985; Bull 1991). *C. lusitanica* has no other phylogenetically or ecologically related species to meet during the postglacial expansion. Its low dispersal ability could explain why an apparently large suitable area is not yet colonized.

#### *A scenario for the historical biogeography of C. lusitanica*

The present-day distribution of *C. lusitanica* may be considered continuous across the whole range, with the exception of a presumed isolate in Serra de Sintra that resulted from an introduction in this century (Arntzen 1999). The joint interpretation of two independent data sets -ecological and genetic - strongly supports a vicariant scenario for the history of populations south and north of the



**Figure 4** – Historical biogeographical scenario for *Chioglossa lusitanica*: A) separation of two Pleistocene refugia; B) postglacial expansion from refugial areas; C) the present species' range; D) secondary contact limited by a zone of less favourable habitat near the valley of the Mondego River.

Mondego River. Climatic changes during the Pleistocene glaciations resulted in subdivision of the species range with refugia located south and north of that river (Fig. 4A). Sequential periods of glaciation and interglacials would have provoked recurrent range contraction and expansion. After the last glacial maximum (ca. 18000 years) a range expansion took place to shape the present-day geographical distribution of the Golden-striped salamander (Figs. 4B and 4C). This scenario is fully compatible with both the nuclear and mtDNA polymorphism (Alexandrino *et al.* 2000) and is strengthened by the bioclimatic modelling of Teixeira (1999). In the south, a secondary contact zone results from the expansion of the two putative refugia and was observed near the Mondego valley (Alexandrino *et al.* 2000), in the exact area where the northern and the southern distribution of *C. lusitanica* would be predicted to meet according to bioclimatic modelling (Teixeira 1999). This valley seems to have played an important role as a geographical barrier for *C. lusitanica*, either producing complete fragmentation or a zone of low population density that limited the introgression between the two groups (Fig. 4D). To the north, the stepwise decrease in genetic variability as measured by heterozygosity, allelic richness and haplotype diversity (Alexandrino *et al.* 2000) is consistent with a major postglacial colonization originated in a southern Douro refugium.

#### *Implications for conservation and future developments*

The use of different but complementary methodologies was useful in the reconstruction of the historical biogeography of *C. lusitanica*. Synthetic genetic maps added an historical dimension to present-day bioclimatic modelling of the species distribution (Fig. 3B) identifying two geographic areas as centres of genetic divergence associated to Pleistocene refugia. We suggest that this area, from the Muradal Mountains to the Douro River, should be central in conservation planning for the species. It should be decided, however, if the two populations units should be granted separate management for conservation. The concept of Evolutionary Significant Units was introduced to help define distinct intraspecific units for conservation (Ryder 1986; Waples 1991; Moritz 1994). Considering that the criteria proposed by Waples (1991) and Moritz (1994) may be too restrictive and

problematic at the intraspecific level (e.g. see Paetkau 1999), we favor a more holistic definition of ESU (Bernatchez 1995; Crandall *et al.* 2000). The northern and southern intraspecific units of *C. lusitanica* were distinguished by concordant genetic variation at several genes, which was paralleled by phenotypic variation, suggesting long-standing evolutionary divergence (Alexandrino *et al.* 2000; submitted). Furthermore, introgression was spatially restricted at the secondary contact zone between the two divergent populations units (Alexandrino *et al.* submitted). We therefore propose that those two units should be considered distinct ESUs for the conservation management of *C. lusitanica*. Their geographic distribution is well synthesized in Figure 2 or Figure 3B and can be readily incorporated in conservation planning.

Additionally, our approach raised questions that can be tested in the future. We speculated that the discrepancy between the present-day distribution of *C. lusitanica* and that predicted by bioclimatic modelling is associated to an expanding range. If this holds true, salamander populations at the edge of the expansion would be particularly suitable for long-term studies of the expansion process as well as for monitoring spatial distribution and abundance associated to climate change. The combination of methods is open for development as far as paleoecological data accumulate, improving simulations of historical species distributions and allowing proper comparison with phylogeographical patterns (McGuigan *et al.* 1998; Teixeira 1999). We anticipate that this approach can be successfully applied to an enormous variety of organisms as an objective and practical tool for the identification of biodiversity hotspots within single species, especially in refugial areas where species diversification occurred.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the ‘Instituto da Conservação da Natureza’ (ICN), the ‘LIFE’ program of the European Community and the ‘Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica’ (PRAXIS XXI/BD/5917/95 PhD grant to JA). Licensing was provided by ICN for Portugal and by the Galician and Asturian ‘Junta de Medio Ambiente’ for Spain.

---

**References**

- Alexandrino J, Ferrand N, Arntzen JW (1997) Genetic variation in some populations of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela), in Portugal. *Biochemical Genetics*, **35**, 371-381.
- Alexandrino J, Froufe E, Arntzen JW, Ferrand N (2000) Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology*, **9**, 771-781.
- Alexandrino J, Ferrand N, Arntzen JW. Morphological variation in two genetically distinct groups of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Submitted*.
- Alexandrino J, Ferrand N, Arntzen JW. Allozyme variation at the contact zone of two genetically distinct groups of the golden-striped salamander *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela), with the description of a new subspecies. *Submitted*.
- Arntzen JW (1999) *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 - Goldstreifensalamander. In: Grossenbacher K, Thiesmeier B (eds) *Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas*. AULA-Verlag, Wiesbaden, pp 301-321.
- Austin GE, Thomas CG, C. HD, Thompson BA (1996) Predicting the spatial distribution of the buzzard *Buteo buteo* nesting areas using Geographical Information Systems and Remote Sensing. *Journal of Applied Ecology*, **33**, 1541-1550.
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, **7**, 371-379.
- Barbadillo LJ, Lacomba JI, Pérez-Mellado V, Sancho V, López-Jurado LP (1999) *Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias: Guía ilustrada para conocer todas las especies*. Editorial GeoPlaneta S.A., Barcelona, Spain.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 113-148.

- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, **7**, 367-369.
- Bernatchez L (1995) A role for molecular systematics in defining evolutionary significant units in fishes. *American Fisheries Society Symposium*, **17**, 114-132.
- Bosch E, Calafell F, Perez-Lezaun A, Comas D, Mateu E, Bertranpetit J (1997) Population history of North Africa: evidence from classical genetic markers. *Human Biology*, **69**, 295-311.
- Brito JC, Brito e Abreu F, Paulo OS, Rosa HD, Crespo EG (1996) Distribution of Schreiber's green lizard (*Lacerta schreiberi*) in Portugal: a predictive model. *Herpetological Journal*, **6**, 43-47.
- Brito JC, Paulo OS, Crespo E G (1998) Distribution and habitats of Schreiber's green lizard (*Lacerta schreiberi*) in Portugal. *Herpetological Journal*, **8**, 187-194.
- Bull, CM (1991) Ecology of parapatric distributions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **22**, 19-36.
- Cavalli-Sforza L, Menozzi P, Piazza A (1993) Demic expansions and human evolution. *Science*, **259**, 639-646.
- Cavalli-Sforza L, Menozzi P, Piazza A (1994) *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 290-295.
- Eastman JR (1997) *Idrisi for Windows: User's Guide. Version 2.0*. Clark University, Worcester, USA.
- Godinho R, Paulo OS, Ferrand N, Luís C, Rosa HD, Crespo EG. Genetic characterization of Iberian Schreiber's green lizard (*Lacerta schreiberi*): protein data. *Submitted*.
- Golden Software (1996) *Surfer for Windows (Win32): Surface Mapping System, Version 6.04*. Golden Software, Inc., Golden.

- Guinand B, Eastal S (1996) Multivariate patterns of genetic differentiation support complex colonization schemes in *Bufo marinus* populations. *Evolution*, **50**, 944-951.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907-913.
- Le Corre V, Roussel G, Zanetto A, Kremer A (1998) Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. III. Patterns of variation identified by geostatistical analyses. *Heredity*, **80**, 464-473.
- McGuigan K., McDonald K, Parris K, Moritz C (1998) Mitochondrial DNA diversity and historical biogeography of a wet forest-restricted frog (*Litoria pearsoniana*) from mid-east Australia. *Molecular Ecology*, **7**, 175-186.
- Menozi P, Piazza A, Cavalli-Sforza L (1978) Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science*, **201**, 786-792.
- Mladenoff DJ, Sickley TA (1998) Assessing potential grey wolf restoration in the northeastern United States: a spatial prediction of favourable habitat and potential population levels. *Journal of Wildlife Management*, **62**, 1-10.
- Moritz C (1994) Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375.
- Paetkau D (1999) Using genetics to identify intraspecific conservation units: a critique of current methods. *Conservation Biology*, **13**, 1507-1509.
- Pereira J, Itami R (1991) Gis-based habitat modelling using logistic multiple regression: a study of the Mt. Graham Red Squirrel. *Photogrammetric Engineering & Remote Sensing*, **57**, 1475-1486.
- Piazza A, Menozzi P, Cavalli-Sforza L (1981) The making and testing of geographic gene-frequency maps. *Biometrics*, **37**, 635-659.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, **1**, 9-10.

- StatSoft (1993) *STATISTICA for Windows, Release 4.5*. StatSoft Inc., Tulsa.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A, Cosson J (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- Teixeira J (1999) *Biogeografia de Salamandra-lusitânica: utilização de Sistemas de Informação Geográfica na modelação da distribuição*. MSc Thesis, University of Porto, Portugal.
- Teixeira J, Arntzen JW. Biogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*: a field survey and spatial modelling approach. *Submitted*.
- Velázquez A, Bocco G (1994) Modelling conservation alternatives with ILWIS: a case study of the volcano rabbit. *ITC Journal*, **1994**, 197-204.
- Vences M (1997) *Chioglossa lusitanica* Barboza du Bocage, 1864. Salamandra rabilarga; Salamandra-dourada. In: Pleguezuelos JM (eds) Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal. Universidad de Granada & A.H.E., Granada, pp 103-105
- Walker PA (1990) Modelling wildlife distributions using geographic information system: kangaroos in relation to climate. *Journal of Biogeography*, **17**, 279-289.
- Waples RS (1991) Pacific salmon, *Oncorhynchus spp.*, and the definition of 'species' under the endangered species act. *Marine Fisheries Review*, **53**, 11-22.

## 5. Discussão Geral

### 5.1. Diversidade genética em *C. lusitanica*

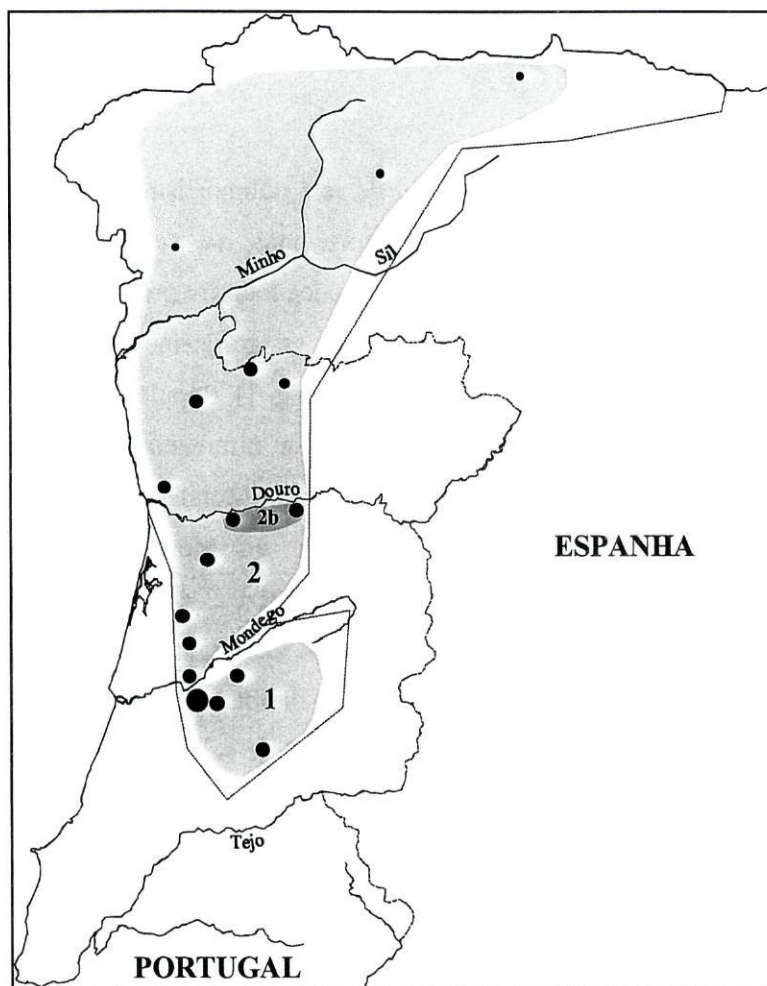
#### 5.1.1. A descoberta de duas unidades populacionais geneticamente distintas

##### *Polimorfismos proteicos*

A variação genética observada ao nível de sete polimorfismos proteicos permitiu revelar uma elevada estruturação populacional na salamandra *Chioglossa lusitanica* (Artigos I e II). A diversidade genética total foi principalmente atribuída a diferenças entre dois grupos de populações, geograficamente distribuídos a sul (grupo 1) e a norte (grupo 2) do rio Mondego (Fig. 1). Populações do grupo 1 e do grupo 2 geograficamente próximas mostraram uma diferenciação elevada devido à fixação de alelos distintos a norte e a sul do Mondego. A distribuição da diversidade genética em populações a norte do Mondego revelou alguma subestruturação adicional associada com a presença do rio Douro e com a diferenciação observada nas duas populações localizadas imediatamente a sul daquele rio, na Serra de Montemuro e nas proximidades de Tarouca. No entanto, apenas o agrupamento destas duas populações se revelou estatisticamente significativo (grupo 2b; Artigo II). O valor estimado para a diferenciação populacional em *C. lusitanica* ( $F_{st}=0.68$ ) é elevado em comparação com outros organismos em geral (Avice 1994) e semelhante a valores de  $F_{st}$  encontrados em outras espécies de salamandras (Larson *et al.* 1984). Considerando a fixação de alelos distintos no grupo 1 e no grupo 2, em quatro dos sete *loci* analisados (*ADH*, *PEP-C*, *PEP-D* e *PGM-I*), os elevados valores de  $F_{st}$  deverão reflectir essencialmente longos períodos de isolamento geográfico, suficientes para que os processos de mutação e deriva genética tenham originado a fixação de alelos distintos nos núcleos populacionais isolados (Larson 1984, Larson *et al.* 1984).

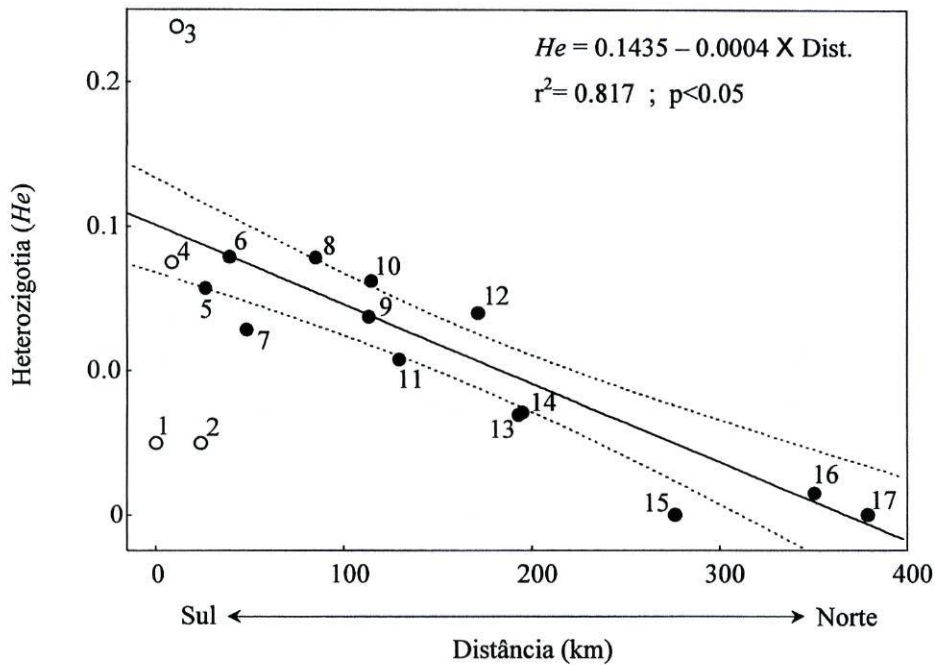
A variabilidade genética, expressa através da heterozigotia e diversidade alélica mostrou, igualmente, valores diversos tanto em populações do grupo 1 como em populações do grupo 2 (Artigo II). A heterozigotia esperada variou entre

zero e 0,149, com exceção da população da Serra da Lousã-Vilarinho (grupo 1) que apresentou um valor muito elevado (0,273). Nesta população, as frequências intermédias em *loci* diagnósticos entre os dois grupos de populações sugerem a existência de fluxo génico recente entre populações geneticamente diferenciadas.



**Figura 1** – Diversidade genética em 17 populações de *Chioglossa lusitanica*. Distribuição de dois grupos geneticamente diferenciados, a sul e norte do Mondego (grupo 1 e 2, respectivamente). No grupo 2, apenas duas populações a sul do Douro se revelaram significativamente diferenciadas (grupo 2b). As populações encontram-se representadas por pontos de diâmetro proporcional à sua heterozigotia esperada.

Nas populações do grupo 2, foi observada uma acentuada redução da variabilidade genética de sul para norte, com um padrão de variação geográfica associado à presença dos rios Douro e Minho/Sil (Fig. 2).

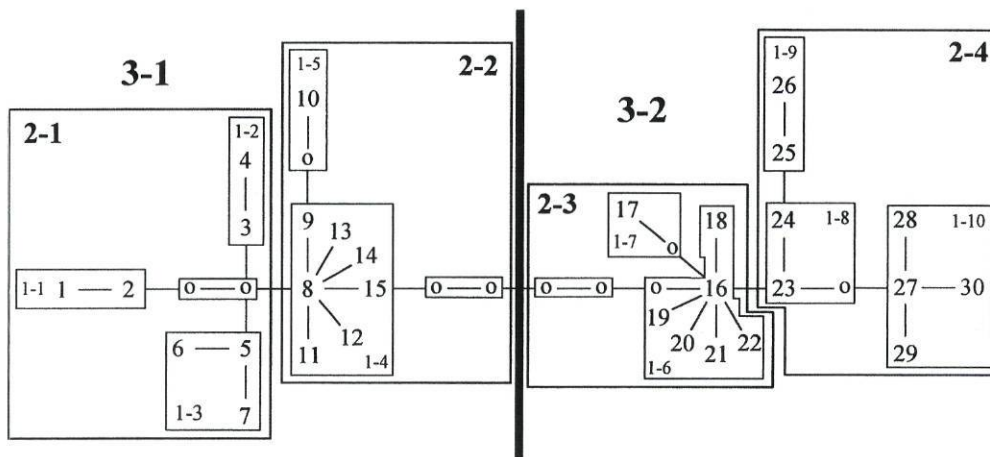


**Figura 2** – Padrão de variabilidade genética em 17 populações de *Chioglossa lusitanica* segundo um eixo sul-norte. As linhas a tracejado representam os limites do intervalo de confiança a 95% para a recta de regressão entre a heterozigotia esperada para populações do grupo 2 e a distância da população mais meridional. As populações do grupo 1 incluem-se para comparação.

A concordância observada na distribuição geográfica de variação genética em sete polimorfismos proteicos sugere que os padrões actuais de diversidade genética de *C. lusitanica* reflectem mais a história de isolamento geográfico das suas populações do que fenómenos de dinâmica populacional recente ou de selecção natural. Dois processos são invocados para explicar os padrões observados (ver 5.2): (i) uma fragmentação histórica no sul da distribuição da espécie provocando a diferenciação de dois grupos populacionais; e (ii) uma expansão geográfica recente que resultou (a) numa redução da variabilidade genética para norte do rio Douro e (b) num aumento da variabilidade genética na zona do rio Mondego, através de contacto secundário entre populações geneticamente diferenciadas.

*Polimorfismo do DNA mitocondrial*

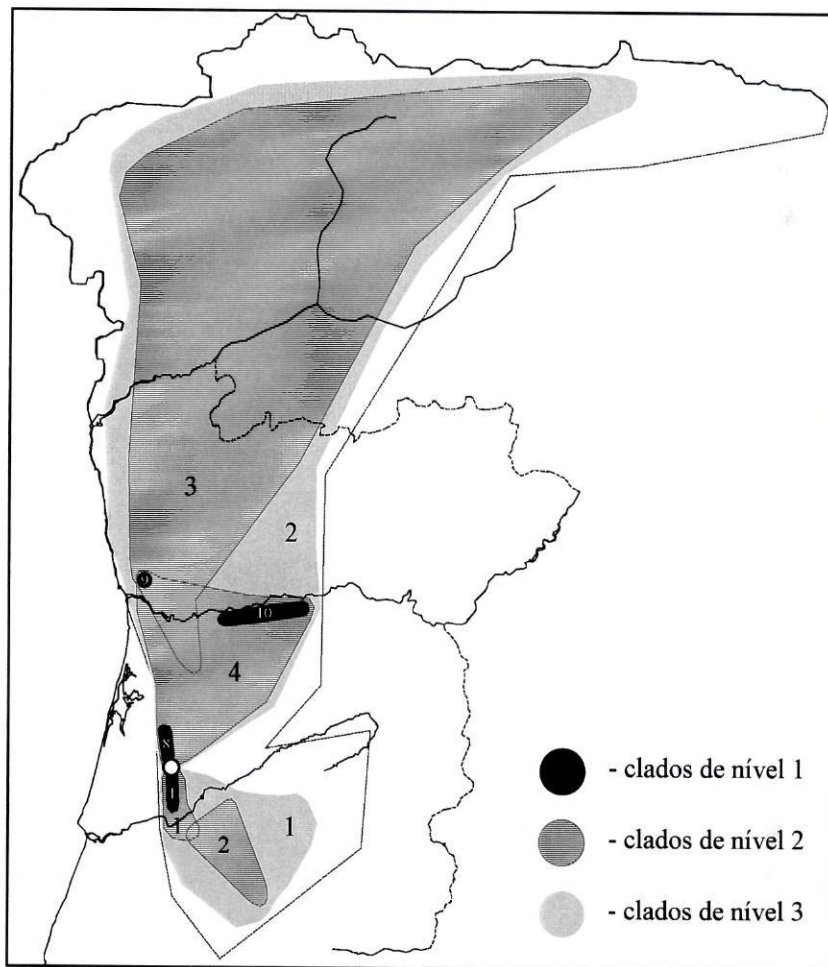
Os padrões geográficos de variação do DNA mitocondrial em *C. lusitana* mostraram-se geralmente concordantes com aqueles encontrados ao nível da variação genética aloenzimática. O conhecimento das relações genealógicas entre os diversos haplótipos de DNA mitocondrial encontrados em *C. lusitana*, para além da sua frequência e distribuição geográfica, permitiu adoptar uma metodologia objectiva de análise que testou a associação geográfica a vários níveis de divergência haplotípica (clados) e utilizou previsões baseadas na teoria da coalescência para inferir os processos evolutivos (fragmentação, expansão geográfica, fluxo génico restrito) que terão determinado os padrões geográficos observados – a “análise cladística hierárquica” (*nested clade analysis*; Templeton *et al.* 1995, Templeton 1998). Nas figuras 3 e 4 apresenta-se uma síntese dos resultados da “análise cladística hierárquica” para o DNA mitocondrial em 17 populações de *C. lusitana* (Artigo III).



**Figura 3** – Cladograma de máxima parsimónia e respectivo agrupamento hierárquico para haplótipos do gene do citocromo *b* do DNA mitocondrial observados em 17 populações de *Chioglossa lusitana*. “0” representa haplótipos hipotéticos. Os polígonos com traço fino englobam clados de nível 1; os polígonos de traço mais grosso englobam clados de nível 2; os dois clados de nível (3-1 and 3-2) são separados por uma linha espessa.

Os padrões geográficos de variação do DNA mitocondrial parecem ter sido determinados principalmente por processos evolutivos históricos, mas também por fenómenos correntes de estrutura populacional. O mais antigo terá sido um

processo de fragmentação histórica, evidenciado pela existência de dois clados divergentes, 3-1 e 3-2, respectivamente distribuídos a sul e a norte da serra do Buçaco, nas cercanias do rio Mondego. Em cada uma destas duas regiões, as populações terão estado sujeitas a fragmentação histórica e a padrões de fluxo génico restrito. A sul, um processo de fragmentação terá isolado a região entre as



**Figura 4** – Representação geográfica da análise hierárquica da variação do DNA mitocondrial (citocromo *b*) em 17 populações de *Chioglossa lusitanica*. A numeração de cada área identifica o clado num determinado nível hierárquico (ver legenda). A localização da serra do Buçaco encontra-se representada por um círculo preenchido a branco.

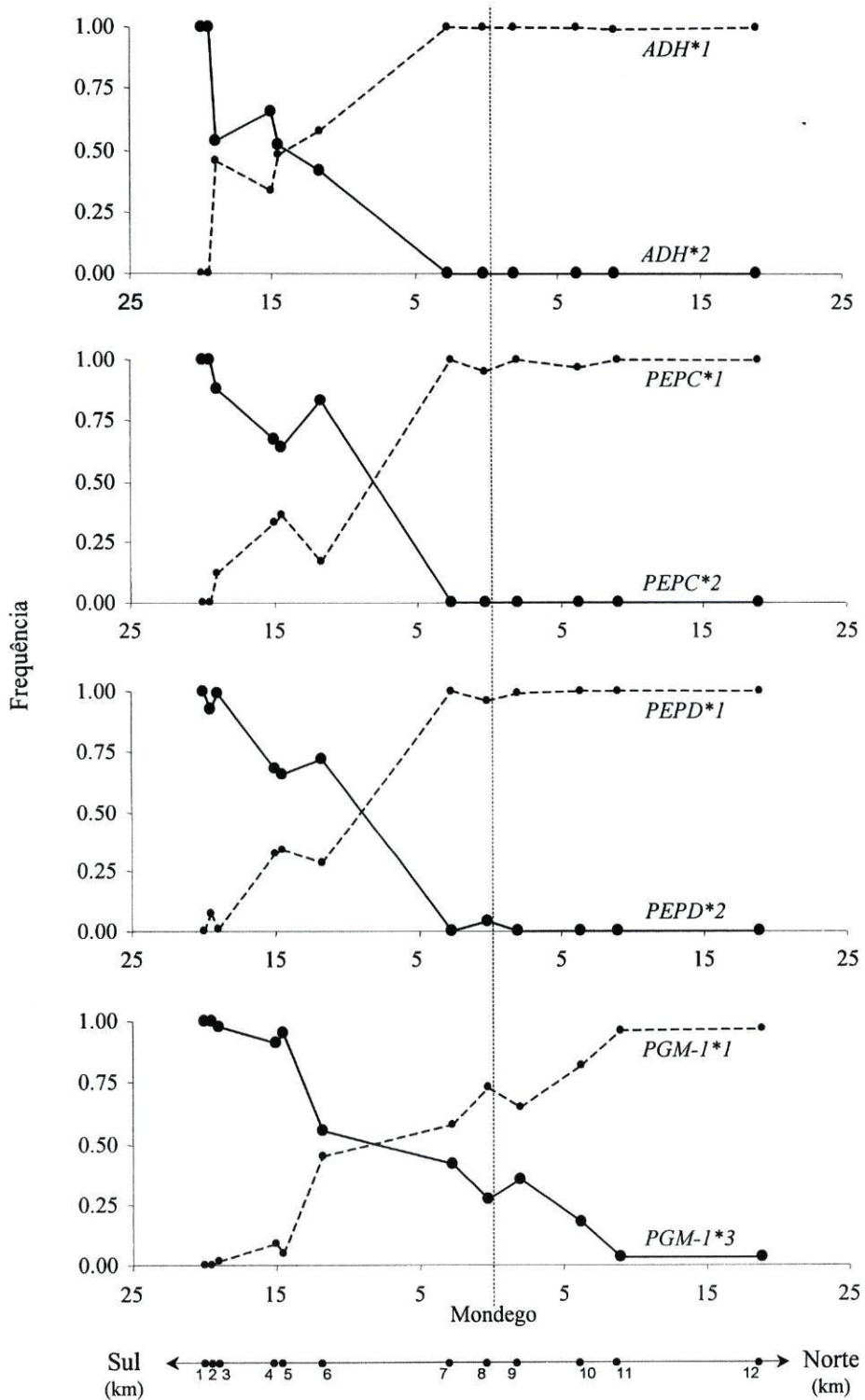
serras Muradal-Açor-Lousã (clados agrupados em 1-4 e 3-1) de outra região compreendida entre as serras Lousã-Buçaco. Nesta última área, os padrões observados foram compatíveis com fluxo génico restrito (clados agrupados em 1-3

e 2-1). A norte, o fluxo génico restrito parece ter sido predominante em toda a área desde o Buçaco até ao norte de Espanha (clados agrupados em 3-2). Nesta região, outros processos de fragmentação terão afectado as áreas mais meridionais, entre o Buçaco e o rio Douro (clados agrupados em 2-4).

A “análise cladística hierárquica” aplicada à variação do DNA mitocondrial em *C. lusitanica* permitiu não só identificar e localizar os processos evolutivos determinantes da diversidade genética observada, mas também utilizar o modelo hierárquico para justapor os acontecimentos numa sequência temporal. O fenómeno de fragmentação histórica inferido para áreas próximas do rio Mondego revelou-se concordante com as interpretações efectuadas a partir da variação aloenzimática (Artigo II). Foram também inferidos processos de fragmentação adicionais em áreas para sul do rio Douro, compreendendo populações localizadas a sul e a norte do rio Mondego. Pelo contrário, o processo de expansão geográfica para norte sugerido pela variação aloenzimática não foi confirmado pela “análise de clados agrupados” do DNA mitocondrial. A ausência de associação geográfica ao nível dos clados que se distribuem para norte do rio Douro deveu-se à predominância de um só haplótipo, que retirou poder de resolução estatístico à análise, não permitindo efectuar qualquer tipo de inferência para esta área. No entanto, a uniformidade genética observada em populações localizadas na região que se estende desde o rio Douro até ao norte de Espanha sugere uma origem recente daquelas populações, através de um processo de expansão geográfica associado a um forte “efeito de fundador”. De facto, Templeton (1998) admite que fenómenos de expansão geográfica deste tipo serão dificilmente detectados pela “análise cladística hierárquica”.

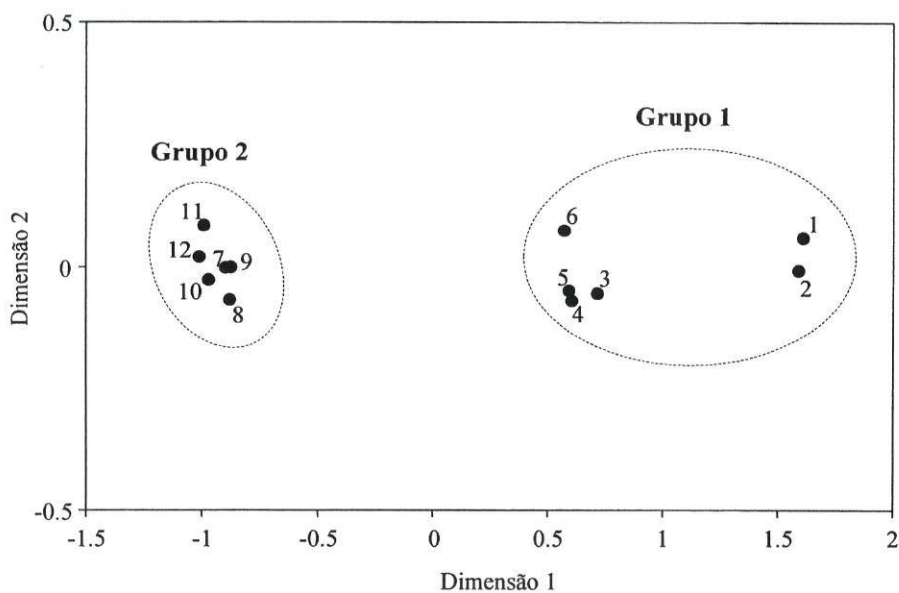
#### **5.1.2. A zona de contacto entre unidades populacionais geneticamente distintas**

A variação genética na zona de contacto entre populações do grupo 1 e populações do grupo 2 de *C. lusitanica* revelou um padrão geográfico de intergradação em quatro *loci* diagnósticos entre os dois grupos, explicando os elevados valores de variabilidade genética observados nesta área (Artigos II e IV). No entanto, nenhuma população apresentou frequências alélicas intermédias para todos os *loci*



**Figura 5** – Variação de frequências alélicas para quatro *loci* aloenzimáticos diagnósticos em populações da zona de contacto entre dois grupos populacionais geneticamente diferenciados de *Chioglossa lusitanica*. O eixo das abcissas representa a distância do rio Mondego num eixo perpendicular ao curso do rio (linha a tracejado).

diagnósticos (Fig. 5). Cada população foi claramente incluída ao grupo 1 ou ao grupo 2 (Fig. 6), localizado a sul e a norte do vale do Mondego, padrão para o qual todos os sete *loci* contribuíram, com exceção do *locus PEP-A* (não informativo). A introgressão no sentido norte-sul revelou padrões semelhantes nos quatro *loci* diagnósticos com as frequências dos alelos característicos das populações do grupo 2 decrescendo gradualmente até zero na população da Serra do Açor (Mata da Margaraça). No sentido inverso, os alelos característicos das populações do grupo 1 foram observados para norte até à população da Serra do Buçaco para o *locus PGM-1*, não sendo observados a norte do vale do Mondego nos outros três *loci* diagnósticos entre os dois grupos populacionais, *ADH*, *PEP-C* and *PEP-D*, sugerindo um padrão de introgressão assimétrico entre diferentes *loci* aloenzimáticos nucleares.



**Figura 6** – Representação dos valores para primeira e segunda dimensões obtidas através de análise multidimensional para distâncias genéticas entre 12 populações *Chioglossa lusitanica* localizadas na zona de contacto entre grupos populacionais distintos (ver Artigo IV). Notar que os eixos apresentam escalas diferentes. Os contornos a tracejado englobam grupos de populações obtidos através do método de agrupamento UPGMA.

A diferenciação genética entre populações da zona de contacto revelou uma associação com a distância geográfica condicionada pela existência de uma barreira geográfica coincidente com o vale do Mondego. Em combinação com os padrões

de introgressão observados e a ausência de desequilíbrio gamético entre pares de *loci*, aquele resultado sugere a existência de miscigenação e a ausência de quaisquer barreiras reprodutoras entre populações geneticamente diferenciadas, sendo, no entanto, a introgressão restringida por uma zona de habitat pouco favorável (ver 5.2).

## 5.2. Interpretação biogeográfica dos padrões de diversidade genética

### *Vicariância e refúgios glaciais*

Os padrões de variação genética observados em *C. lusitanica* sugerem o isolamento histórico de pelo menos duas unidades populacionais, na zona meridional da distribuição actual da espécie (Fig. 7A). Se se admitir que a variação genética se acumula segundo um “relógio molecular” e utilizando calibrações de relógios moleculares para polimorfismos proteicos (0.05-0.1 DNei/Ma; Maxson & Maxson 1979; Thorpe 1982; Beerli *et al.* 1996) e para o gene do citocromo *b* em Salamandrídeos (0.8% de divergência nucleotídica (d)/Ma; Tan & Wake 1995; Caccone *et al.* 1997), a diferenciação observada entre os dois grupos de populações (DNei=0.15, d=1.5-2.2%; Artigos II e III) corresponderia a um período de isolamento genético de 1.5-3 MA, i.e. desde o fim do Plioceno/início do Pleistoceno. Esta ordem de grandeza temporal leva-nos a sugerir que as grandes alterações climáticas e ambientais do Pleistoceno terão sido determinantes na história das populações de *C. lusitanica*.

*Pleistoceno no noroeste Ibérico.* Durante as glaciações do Pleistoceno, terá predominado um clima frio e seco no noroeste da Península Ibérica, particularmente acima do paralelo 40°N, com uma descida da temperatura média anual da ordem dos 8 a 10 °C no sul, e dos 12-17 °C nas regiões mais setentrionais (Brosche 1982). Existem registos descritos para Portugal, especialmente no centro e no norte, de fenómenos de manutenção de neve e de gelo perenes e de congelamento de solos e de pequenas ribeiras, situações características de regiões periglaciares (Vieira & Cordeiro, 1998). O conhecimento sobre fenómenos de glaciação resume-se a algumas áreas do norte e da zona central da Península

Ibérica (Ribeiro *et al.* 1987; Dias 1997; Vieira & Cordeiro 1998), havendo pouca documentação detalhada sobre a paleoecologia da Península Ibérica, e do noroeste Ibérico em particular. Assim, torna-se difícil deduzir os efeitos das alterações climáticas na biogeografia de *C. lusitanica*, embora a associação da distribuição actual da espécie a zonas de clima temperado, historicamente dominadas por floresta caducifólia, sugira uma regressão de *C. lusitanica* para sul, durante os períodos climáticos mais adversos do Pleistoceno, semelhante à reconstruída por Zagwijn (1992) para a floresta caducifólia.

*Fragmentação e barreiras geográficas.* O estudo da diversidade genética em 17 populações de *C. lusitanica* revelou dois grupos de populações geneticamente diferenciados separados pelo rio Mondego, sugerindo que este rio terá constituído uma barreira para o fluxo génico entre populações (Artigo II). No entanto, um estudo mais detalhado da zona de contacto entre aqueles dois grupos mostrou que populações imediatamente a sul do rio Mondego pertenciam ao grupo 2 (Artigo IV), indicando que o vale daquele rio terá sido mais importante na restrição ao fluxo génico entre populações e parecendo contrariar a hipótese inicialmente formulada. De facto, a distribuição actual de *C. lusitanica* apresenta uma constrição exactamente nesta área, onde o vale do Mondego é amplo e constitui uma zona relativamente plana e árida. É provável que, dadas as condições climáticas adversas que existiram em determinados períodos do Pleistoceno, esta área tenha contribuído para uma separação sul-norte, tal como sugerido pela modelação bioclimática de Teixeira (1999). No entanto, quer a possibilidade do rio Mondego ter representado uma barreira geográfica quer a hipótese mais geral de que os grandes rios sejam barreiras para os indivíduos desta espécie, não podem ser completamente abandonadas com base nos resultados obtidos (ver 6.2).

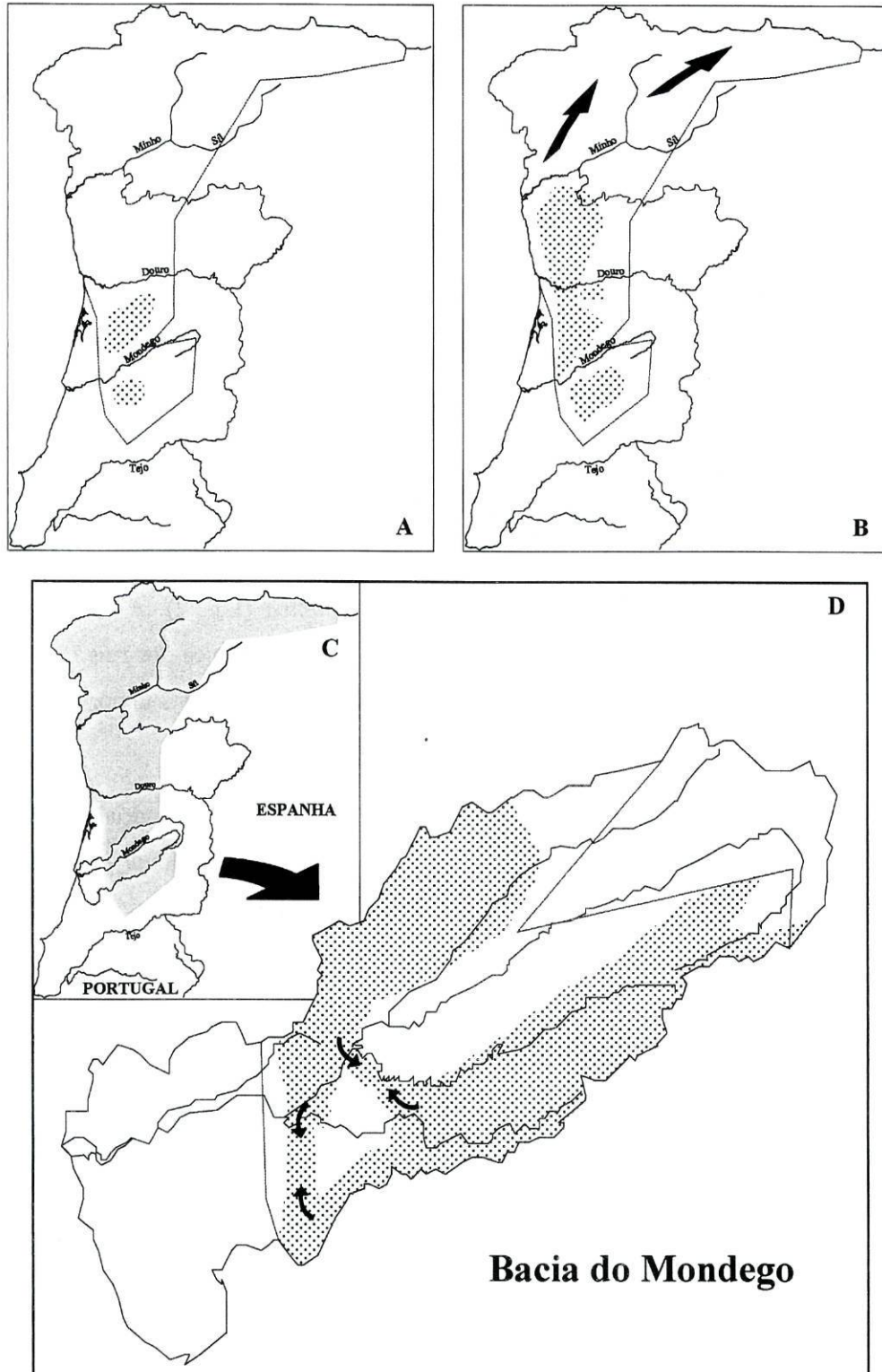
A sul e a norte do Mondego, os processos de fragmentação parecem ter sido comuns na história das populações de *C. lusitanica*. Os dois grupos de populações poderão ter sido constituídos por várias zonas de refúgio, que não estando separadas por barreiras significativas ao fluxo génico, mantiveram níveis reduzidos de diferenciação populacional. A presença de alelos e haplótipos privativos em populações localizadas entre o Mondego e o Douro parece favorecer a hipótese da existência de refúgios múltiplos nesta área. A região de Montemuro apresenta

alguma diferenciação de outras populações do grupo 2 pelo que poderá representar um destes refúgios secundários (Artigos II e III).

#### *Expansão geográfica*

*Recolonização pós-glacial.* A composição genética das populações a norte do rio Douro sugere uma colonização recente a partir de zonas entre os rios Mondego e Douro (Fig. 7B e 7C). Esta expansão geográfica terá sido possível devido à melhoria das condições climáticas e ao reaparecimento de zonas de habitat favorável a norte, nos períodos de pós-glaciação. A fundação repetida de novas populações à custa de um reduzido número de indivíduos originaria, através de deriva genética, um padrão de variação semelhante ao observado nas populações da zona mais setentrional da distribuição de *C. lusitanica* (Fig. 2). A redução da variabilidade genética coincidiu geograficamente com a presença dos rios Douro e Minho, sugerindo que estes cursos de água representaram barreiras importantes no processo de recolonização.

*Contacto secundário.* A variação aloenzimática e do DNA mitocondrial ao longo de toda a distribuição da espécie sugeriu que a zona do vale do Mondego terá sido importante na evolução desta salamandra durante o Quaternário (Artigos II e III). Durante os períodos climáticos desfavoráveis do Pleistoceno, o vale, e, possivelmente, o rio Mondego, terão contribuído para uma separação sul-norte entre populações e para a divergência genética observada entre os dois grupos. Nos períodos de clima mais favorável, o contacto entre as populações a sul e a norte do vale teria sido facilitado por dois corredores montanhosos orientados perpendicularmente ao vale (Fig. 7D), originando o padrão de isolamento pela distância observado em *loci* aloenzimáticos diagnósticos e no gene do citocromo *b* do DNA mitocondrial (clado 3-1; Artigo III). Nesta região, a comparação entre os padrões de intergradação entre *loci* nucleares e entre *loci* nucleares e o DNA mitocondrial sugerem a existência de introgressão assimétrica entre os marcadores genéticos analisados. Padrões de introgressão diferencial em zonas híbridas (*sensu* Arnold 1997) são relativamente comuns e foram observados tanto entre *loci* nucleares como entre *loci* nucleares e citoplasmáticos, podendo ser originados por



**Figura 7** - Cenário biogeográfico histórico provável para *Chiglossa lusitanica*: A) separação de dois refúgios populacionais durante o Pleistoceno; B) expansão pós-glacial a partir das duas zonas de refúgio; C) a espécie atinge a distribuição actual; D) o contacto entre populações dos dois grupos populacionais distintos é limitado por uma zona de habitat menos favorável, coincidente com o vale do rio Mondego.

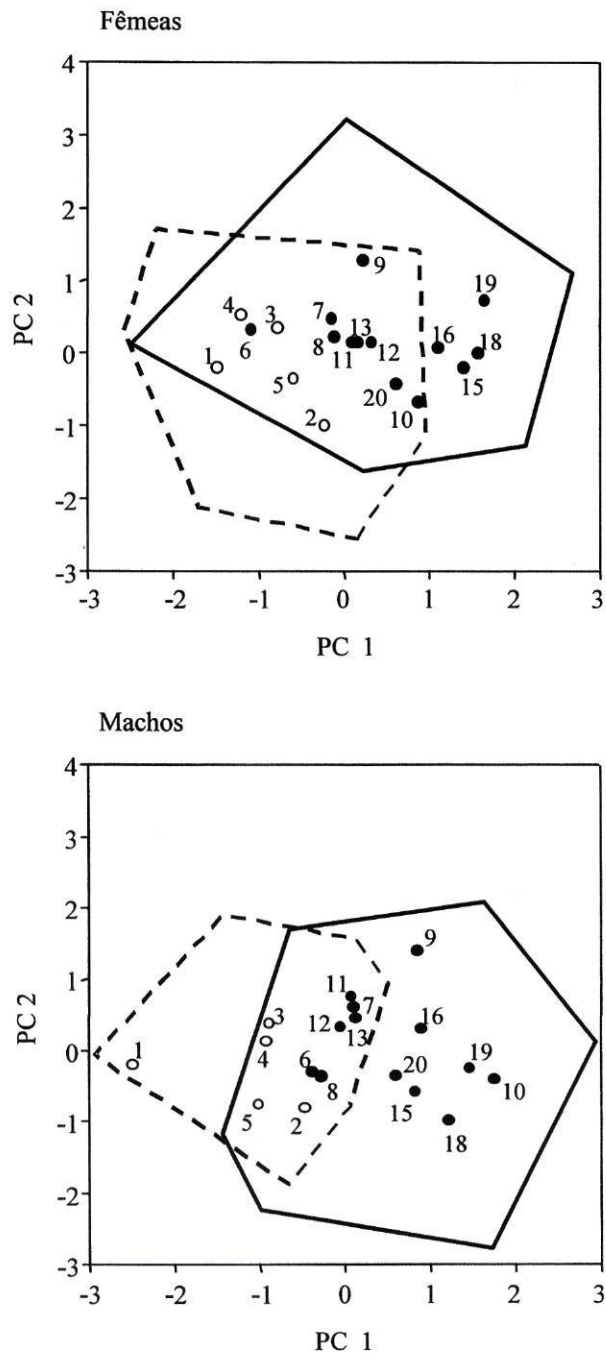
diferentes regimes de selecção natural, por fenómenos estocásticos associados à transmissão de um determinado *locus* (e.g. DNA mitocondrial) ou devido à história do contacto entre populações diferenciadas (e.g. Hunt & Selander 1973; Gyllensten & Wilson 1987; Hewitt 1988; ver Avise 1994). O padrão de introgressão assimétrico observado poderia ter sido originado por períodos de fluxo génico relativamente livre, durante períodos climáticos mais húmidos. Não havendo selecção negativa sobre os indivíduos de origem “híbrida”, a recombinação génica e sucessivos retrocruzamentos poderiam ter quebrado as combinações alélicas parentais, permitindo que marcadores sujeitos a selecção positiva ou neutrais atravessassem individualmente a zona de contacto, contribuindo assim para um padrão de introgressão não coincidente ao nível de vários *loci* (Hewitt 1993). Os padrões geográficos de variação genética nesta zona poderiam ter-se tornado ainda mais complexos devido a sucessivos episódios de isolamento e contacto secundário entre as populações a sul e a norte do vale do Mondego, acompanhando os ciclos climáticos do Pleistoceno.

### 5.3. Diversidade fenotípica

A descoberta de unidades populacionais geneticamente diferenciadas torna interessante o estudo comparativo da diversidade fenotípica. Os caracteres morfológicos são controlados por mecanismos de ordem genética e ambiental e, numa perspectiva evolutiva, torna-se importante determinar se a diferenciação morfológica reflecte a adaptação a condições ambientais locais ou relações filogenéticas. A existência de paralelismos para a variação de diferentes características, e.g. morfologia e genética, é esperada como resultado de diferenciação genética por fragmentação geográfica, o mesmo não acontecendo no caso de uma maior influência de fenómenos de selecção natural. A análise estatística de caracteres morfométricos constitui uma forma de testar hipóteses sobre o grau e a natureza da diversidade fenotípica, podendo ser útil em organismos em que a diferenciação genética é críptica, como os anfíbios urodelos (Larson 1984; Good & Wake 1992; Tarkhnishvili *et al.* 2000).

Os padrões geográficos de variação morfométrica em *C. lusitanica* mostraram-se parcialmente concordantes com a diferenciação genética descrita para a espécie (Artigo V). As populações localizadas a sul do rio Mondego (grupo 1) caracterizam-se por um menor comprimento relativo dos dígitos de ambos os membros, anterior e posterior, quando comparadas com populações a norte do Mondego. Foi encontrado um padrão de variação clinal em sobreposição àquela dicotomia, com um aumento de sul para norte das dimensões dos membros e dedos respectivos (Fig. 8). A dicotomia e a variação gradual poderão ser explicadas, respectivamente, através de processos históricos de isolamento geográfico entre populações e de selecção natural. A redução do tamanho dos membros poderá representar uma adaptação a condições ambientais mais áridas, pela redução da relação volume/superfície (Nevo 1972; Lee 1993). *C. lusitanica* é extremamente dependente de habitats saturados de humidade, sendo o nível de precipitação anual determinante da sua área de distribuição em Portugal (Teixeira 1999). Se assumirmos a existência de gradientes de precipitação passados semelhantes aos actuais, é provável que processos selectivos tivessem actuado para originar a variação clinal observada. Uma questão intrigante, no entanto, é o facto dos processos de isolamento genético e de selecção natural terem actuado diferencialmente ao nível dos dígitos e dos membros.

Por outro lado, a variação observada no padrão de coloração dorsal de *C. lusitanica* não se revelou associada nem com a diferenciação genética entre os dois grupos de populações nem com um padrão de isolamento pela distância (associação da variação observada com a distância geográfica). No entanto, a variabilidade populacional para o padrão de coloração foi máxima na zona de contacto secundário entre populações do grupo 1 e do grupo 2, sugerindo que a mistura de genomas diferenciados se terá reflectido num aumento da variabilidade fenotípica. Nas populações do grupo 2 verificaram-se outros padrões concordantes entre a morfologia de *C. lusitanica* e a sua diversidade genética. Primeiro, estas populações são caracterizadas por uma redução da variabilidade do padrão de coloração dorsal de sul para norte, com tendência para a fixação do padrão típico para a espécie nas populações a norte do rio Douro. Os processos de redução drástica do efectivo populacional e deriva genética, associados a uma expansão



**Figura 8** – Análise de componentes principais de seis variáveis morfométricas em 18 populações de *Chioglossa lusitanica*. As populações do grupo 1 (círculos não preenchidos) e do grupo 2 (círculos preenchidos) são representadas pelo seu centróide ou ponto médio. Os polígonos englobam os valores do conjunto dos indivíduos do grupo 1 (a tracejado) e do grupo 2 (a cheio).

geográfica (Artigo II e III), parecem aplicar-se igualmente para explicar aquele padrão de variação morfológica. Segundo, a predominância de um padrão de coloração quase exclusivo das populações da zona sul da bacia do rio Douro (populações da Serra de Montemuro e de Tarouca) é concordante com a presença local de alelos nucleares e citoplasmáticos privados, bem como compatível com a hipótese de ter ocorrido um processo histórico de fragmentação associado a uma zona de refúgio no Pleistoceno (Artigos II e III). Estes paralelos estabelecidos entre a variação morfológica e genética são de alguma forma surpreendentes pois é provável que a coloração críptica de *C. lusitanica* esteja sob um forte regime selectivo, por oposição ao carácter supostamente neutral da diversidade genética observada na espécie.

A elevada diferenciação genética observada em populações de *C. lusitanica* não é acompanhada por níveis comparavelmente elevados de diferenciação morfológica. Processos de diferenciação críptica e variação clinal são características comuns a muitas espécies de anfíbios (Larson 1984; Good & Wake 1992; Green *et al.* 1996; Carlin 1997; Tarkhnishvili *et al.* 2000). A notável convergência evolutiva entre salamandras que ocupam habitats nas margens de cursos de água, como por exemplo *C. lusitanica* e uma espécie filogeneticamente distante como a salamandra *Eurycea longicauda*, sugere que poderão existir constrangimentos à evolução a partir de um morfótipo altamente especializado (Tarkhnishvili 1994).

#### **5.4. História das populações, biogeografia actual e conservação de *C. lusitanica***

Os padrões geográficos de diversidade genética observados em *C. lusitanica* através de marcadores nucleares e citoplasmáticos sugerem uma subdivisão histórica da distribuição da espécie em dois refúgios Pleistocénicos, a existência de uma zona de contacto secundário perto do rio Mondego, e um processo recente de expansão pós-glacial para norte do rio Douro (Artigos II, III e IV). Os processos biogeográficos propostos para a história de *C. lusitanica* são importantes para identificar áreas de persistência histórica das populações e de maior diversidade genética. Por outro lado, a modelação ecológica da distribuição da espécie

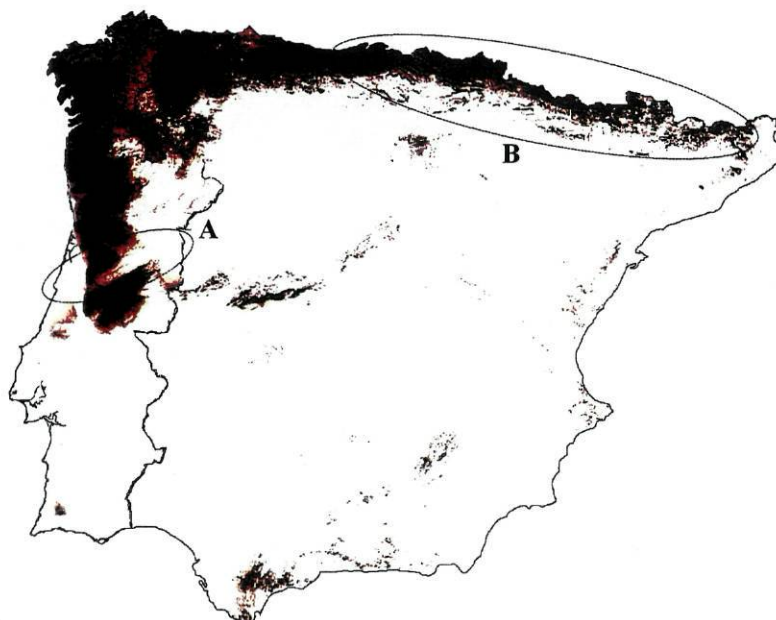
(Teixeira 1999) apresenta uma imagem da sua biogeografia actual e permite identificar zonas de habitat mais ou menos favorável para a espécie. Estes dois tipos de informação biogeográfica representam escalas temporais distintas, devendo ser considerados paralelamente na identificação de áreas prioritárias para a conservação de *C. lusitanica*. Assim, foram adoptadas duas estratégias para prosseguir este objectivo: i) análise paralela dos dois tipos de informação, procurando reinterpretar a biogeografia actual de *C. lusitanica* à luz de processos populacionais históricos e vice-versa; ii) sobreposição de mapas geográficos representativos dos dois tipos de informação para identificar áreas que representem, simultaneamente, zonas de habitat actualmente favorável para a espécie e onde a persistência histórica das populações tenha sido elevada.

#### *Biogeografia actual e história das populações*

O modelo espacial da distribuição de *C. lusitanica* na Península Ibérica (Fig. 4; Teixeira 1999) revelou-se importante na reconstrução da biogeografia histórica da espécie. O vale do rio Mondego foi associado a uma baixa probabilidade de ocorrência para a espécie, quase dividindo zonas localizadas a sul e a norte do Mondego (Fig. 9A). Este facto reforça a hipótese de um processo de fragmentação histórica nesta área em períodos com condições climáticas adversas semelhantes aos que se sucederam no Pleistoceno (ver Artigos II, III e IV).

A ocorrência de *C. lusitanica* foi prevista pelo modelo para várias áreas montanhosas da Península Ibérica onde a espécie não ocorre (Fig. 9). A ausência da espécie nestas áreas aparentemente favoráveis poderá resultar de processos biogeográficos históricos em combinação com os exigentes requisitos ecológicos e baixa capacidade de dispersão da espécie, não permitindo a colonização daquelas áreas. No caso das zonas montanhosas do centro e sul da Península Ibérica, poderá ser útil estabelecer uma comparação com o lagarto-de-água *Lacerta schreiberi*, uma espécie com uma distribuição na zona noroeste e central da Península mas que ocorre em isolados populacionais em zonas montanhosas do sul de Portugal (Brito *et al.* 1998). A modelação da distribuição de *L. schreiberi* (Brito *et al.* 1996) e a diversidade genética das suas populações (Godinho 1997; Godinho *et al.* submetido) sugere que aqueles isolados populacionais terão resultado de

fragmentação do habitat associada ao aumento da temperatura após o último máximo glacial (18.000 anos). Estas zonas poderão ser os vestígios de uma distribuição histórica mais extensa do que a de *C. lusitanica* devido a requisitos ecológicos menos exigentes e a uma maior capacidade de dispersão.



**Figura 8** – Modelo bioclimático preditivo da distribuição de *Chioglossa lusitanica* na Península Ibérica (Teixeira 1999): A) vale do Mondego; B) nordeste peninsular, onde *C. lusitanica* não ocorre.

Por outro lado, a ausência de *C. lusitanica* do nordeste de Espanha, numa zona de habitat aparentemente favorável, que se estende desde a Cantábria até aos Pirinéus (Fig. 9B) poderá ter uma explicação diversa. Vences (1997) sugeriu que o tipo de solo existente nesta área seria desfavorável para *C. lusitanica*. O efeito de um factor ecológico limitante não previsto pelo modelo de Teixeira (1999) não pode, na verdade, ser excluído para explicar esta incongruência. No entanto, a reconstrução da biogeografia histórica efectuada para *C. lusitanica* através dos padrões geográficos de diversidade genética sugere uma outra explicação: a existência de um processo de expansão geográfica da espécie que ainda não atingiu os limites da sua área potencial de distribuição. Este facto poderia ser explicado, por um lado, pela lentidão do processo de expansão em *C. lusitanica* e, por outro,

pela ausência de barreiras geográficas ou biológicas à progressão da expansão. A comparação com *L. schreiberi* pode ser útil novamente. Esta espécie ocorre ao longo da região nordeste de Espanha até à fronteira francesa onde forma uma zona de contacto secundário com um outro lacertídeo *L. bilineata*, com os respectivos limites parapátricos de distribuição a serem mantidos por competição interespecífica (Barbadillo *et al.* 1999). De facto, vários mecanismos (e.g. competição, hibridação, interferência reprodutiva, transmissão de parasitas) poderão contribuir para dificultar a interpenetração geográfica de duas espécies (Barton & Hewitt 1985; Bull 1991). O facto de *C. lusitanica* não encontrar uma espécie ecológica e/ou filogeneticamente próxima, em conjunto com sua baixa capacidade de dispersão, poderão explicar a continuidade do seu processo de expansão geográfica, bem como o facto de uma extensa área de habitat favorável não ter sido ainda colonizada. A confirmação desta hipótese constituiria uma excelente oportunidade para estudar os processos de dinâmica populacional na frente de expansão bem como para realizar estudos de monitorização sobre os efeitos de alterações climáticas no processo de expansão de *C. lusitanica* em direcção ao nordeste peninsular.

#### *Mapas sintéticos da diversidade genética*

A análise de componentes principais da variação genética em seis polimorfismos proteicos permitiu sintetizar os padrões geográficos observados através de duas variáveis principais ou sintéticas, que foram representados em mapas geográficos (Figs. 10A e 10B) – mapas genéticos sintéticos (Menozzi *et al.* 1978). A primeira variável sintética permite explicar 70% da variação total observada, representando a diferenciação genética num eixo sul-norte, desde a serra do Muradal no centro de Portugal até Salas no norte de Espanha (Fig. 10A). O gradiente acentuado de variação observado no vale do Mondego reflecte o contacto entre grupos de populações historicamente isolados (Artigo II). O segundo eixo representou 25% da variação total, evidenciando um gradiente de difusão centrado na região da serra de Montemuro (Fig. 10B) que reflecte a diferenciação genética daquelas populações. Adicionalmente, poderá sugerir um processo de expansão a partir de núcleos populacionais após isolamento genético (Menozzi *et al.* 1978).



**Figura 10** – Análise de Componentes Principais de 9 frequências alélicas independentes nos loci *PGMI*, *PEPB*, *PEPC*, *PEPD*, *PGD* and *ADH* em 17 populações de *Chioglossa lusitanica*: A) Mapa genético sintético da primeira Componente Principal, representando 70% da variação total observada; B) Mapa genético sintético da segunda Componente Principal, representando 25% da variação total observada.

A sobreposição gráfica dos dois mapas sintéticos da variação proteica observada em *C. lusitanica*, usando o vermelho para o primeiro eixo e o azul para o segundo eixo, representa claramente dois grupos populacionais diferenciados, a sul e a norte do Mondego (Fig. 11). O padrão geográfico para as populações no norte

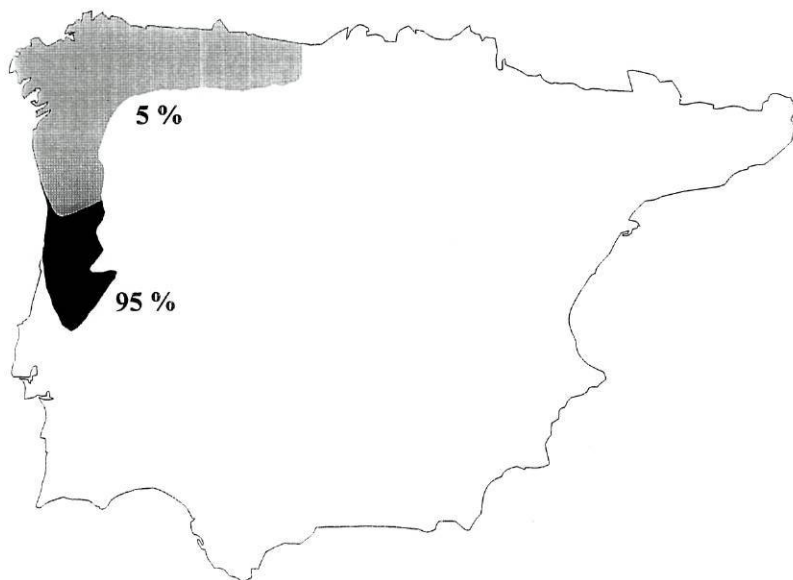
da distribuição representa a uniformidade genética observada nestas populações, que terá resultado de um processo de expansão geográfica recente a partir de populações a sul do Douro (Artigos II e III).



**Figura 11** – Análise de Componentes Principais de 9 frequências alélicas independentes nos loci *PGMI*, *PEPB*, *PEPC*, *PEPD*, *PGD* and *ADH* em 17 populações de *Chioglossa lusitanica*. Representação conjunta das duas primeiras Componentes Principais, representando 95% da variação total observada.

*Distribuição geográfica da diversidade genética.* A diversidade genética pode também ser representada de uma forma geograficamente cumulativa a partir de um centro de origem, especialmente quando se tenha verificado um processo de expansão geográfica recente. No caso de *C. lusitanica*, foi inferido um processo de expansão de sul para norte dando origem à parte setentrional da distribuição da espécie. Para representar a diversidade genética desta forma direccional, foi utilizado um índice de diversidade genética que, para um determinado conjunto de populações, multiplica os valores de diversidade genética estimada por valores de *Fst* pela percentagem da diversidade alélica contida nesse conjunto de populações. O valor para cada área geográfica será então uma percentagem do valor máximo atingido para toda a área de distribuição da espécie. A sua representação para *C. lusitanica* apresenta-se na figura 12. Como era de esperar, os territórios até ao rio

Douro contém a maior parte da diversidade genética (95%). A vasta área para norte, que representa mais de 60% da distribuição actual da espécie representa apenas 5% da diversidade genética total observada em sete *loci* aloenzimáticos.



**Figura 12** – Distribuição assimétrica da diversidade genética em *Chioglossa lusitanica*: a área a negro representa 95% da diversidade genética observada; a área a cinzento claro representa 5% da diversidade genética observada.

#### *Identificação de áreas importantes para a conservação*

O uso de diferentes metodologias complementares foi útil para a reconstrução da história biogeográfica de *C. lusitanica*. Os mapas genéticos sintéticos acrescentaram uma dimensão histórica à modelação da distribuição da espécie (Fig. 11), identificando uma área de maior persistência histórica e diversidade genética das populações, correspondendo a dois centros distintos de diferenciação genética associados a refúgios Pleistocénicos. Assim, é nesta área, que se estende desde as Serras de Alvelos e Muradal até ao rio Douro, que se deverá centrar futuramente a conservação da diversidade genética de *C. lusitanica*. No entanto, põe-se o problema de decidir se a conservação das duas unidades populacionais agora identificadas deverá ser efectuada separadamente ou garantindo os níveis de fluxo génico que se verificam presentemente.

O conceito de Unidades Evolutivas Significativas (ESUs) foi introduzido por Ryder (1986) para facilitar a definição de unidades intraespecíficas importantes para a conservação, considerando que “ESUs” seriam populações com características adaptativas distintas com base na concordância de diferentes tipo de informação (e.g. ecológica, morfológica, genética). Posteriormente, Waples (1991) enfatizou a importância do isolamento reprodutivo (genético ou apenas geográfico) entre populações e Moritz (1994) introduziu um critério objectivo para a definição de “ESUs”, a existência de populações com linhagens monofiléticas de DNA mitocondrial. A aplicação destes dois critérios para a definição de “ESUs” poderá ser problemática a nível intraespecífico pois, se no caso da definição de Waples (1991) existe uma aproximação ao conceito biológico de espécie, a distinção de linhagens monofiléticas pode ser dificultada pela persistência de polimorfismos ancestrais (Paetkau 1999). Bernatchez (1995) e Crandall *et al.* (2000) argumentam a favor de uma definição holística que tenha em conta fenómenos históricos e recentes de isolamento ecológico e genético. No caso de *C. lusitanica*, foram reveladas duas unidades populacionais geneticamente distintas, que terão resultado de um longo processo de evolução divergente (Artigos II e III). Estas duas subunidades intraespecíficas revelaram-se igualmente distintas ao nível de caracteres morfológicos adaptativos, sugerindo isolamento ecológico, embora com reduzidos níveis de diferenciação (Artigo V). Por outro lado, foi detectada uma zona de contacto secundário, com um padrão de introgressão espacialmente limitado por uma zona de baixa densidade populacional (Artigo IV). Assim, e adoptando um conceito holístico de “ESU” próximo do de Bernatchez (1995), propõe-se que as unidades populacionais sejam consideradas duas ESUs distintas para a conservação de *C. lusitanica*. Embora a gestão das populações das duas ESUs deva ser largamente independente, sugere-se que seja assegurada a manutenção dos processos evolutivos que terão originado e mantido o processo de diferenciação garantindo os níveis de fluxo génico existentes na zona de contacto. A distribuição geográfica das duas unidades populacionais relevantes para a conservação de *C. lusitanica* encontra-se representada de forma adequada na figura 11, pelo que se propõe aquela delimitação macrogeográfica seja considerada no planeamento da estratégia de conservação para a espécie.

### 5.5. Implicações taxonómicas

A diferenciação genética entre os dois grupos de *C. lusitanica* foi descrita através da distância genética de Nei (1978) para 22 *loci* aloenzimáticos ( $D_{Nei} = 0.15$ ) e da divergência média observada nas sequências do gene do citocromo *b* do DNA mitocondrial ( $d = 2.2\%$ ), correspondendo a um período de isolamento genético de 1.5-3 Ma se se assumir um relógio molecular e utilizando calibrações de relógios moleculares para aloenzimas e para o citocromo *b* de Salamandrídeos (ver Artigo II e referências aí contidas). Os níveis de diferenciação morfológica são comparativamente baixos em *C. lusitanica*, mas foram observados padrões de variação morfológica paralelos aos da variação genética, particularmente ao nível do comprimento relativo dos dígitos anteriores e posteriores (Artigo V).

A longa história de evolução independente dos dois grupos populacionais geneticamente diferenciados de *C. lusitanica* justifica o seu reconhecimento a nível taxonómico. Não parecendo existir isolamento reprodutivo entre os dois grupos de populações, não deverão ser consideradas como duas espécies biológicas segundo o Conceito Biológico de Espécie (Mayr 1942), devendo ser-lhes atribuído um estatuto subespecífico com base na concordância evidenciada através não só de variação genética ao nível de vários genes mas também de variação morfológica (Avice & Ball 1990). Assim, propõe-se que as populações distribuídas a sul e a norte do vale do rio Mondego sejam reconhecidas como subespécies distintas de *C. lusitanica*.

A Serra do Buçaco é reconhecida como sendo a localidade de origem do tipo de *C. lusitanica*, o que poderia ser considerado problemático pois a zona de contacto entre os dois grupos abrange o Buçaco (Artigo II, Artigo III e Artigo IV). No entanto, a população do Buçaco foi claramente incluída ao grupo 2 segundo a variação genética aloenzimática e a variação morfológica, mas sendo de origem híbrida no que se refere à variação do DNA mitocondrial. Assim, considera-se que, para efeitos taxonómicos, o Buçaco é a localidade tipo para a subespécie de distribuição mais setentrional (grupo 2), *C. l. lusitanica*, e propõe-se que a Serra do Açor seja considerada a localidade tipo da nova subespécie, que se distribui desde a Serra da Lousã, para este até à Serra da Estrela e para sul até às Serras de Alvelos e

Muradal, e que se denominará *C. l. brevitarsis* (devido aos dígitos proporcionalmente mais curtos).

*Descrição do holotipo de C. l. brevitarsis.* Macho adulto da Mata da Margaraça, na Serra do Açor, com 14,00 cm de comprimento total, dos quais 32% correspondem ao comprimento do corpo (4,56 cm) e 68% ao comprimento da cauda (9,44 cm). Outras medidas morfométricas relevantes: comprimento da cabeça, 1,12 cm; largura da cabeça, 0,71 cm; comprimento do membro anterior, 1,23 cm; comprimento do 3º dedo da pata anterior, 0,23; comprimento da pata posterior, 1,37 cm; comprimento do 4º dedo da pata posterior, 0,29. Dorso escuro acastanhado com o padrão típico de coloração composto de duas bandas acobreadas que se unem dorsalmente na região pélvica a se prolongam em banda única pela cauda. Zona ventral escura acastanhada com pontuações cinzento-claro dispersas.

## 5.6. Considerações finais

### *Perspectivas de investigação futura em C. lusitanica*

O presente trabalho permitiu revelar padrões de diversidade genética em *C. lusitanica* que reflectem essencialmente processos evolutivos históricos. No entanto, é muito provável que aqueles padrões não correspondam à estruturação populacional actual da espécie. A hipótese de os grandes cursos de água serem uma barreira para a dispersão destas salamandras é uma questão em aberto, não respondida pelos resultados até agora obtidos. Da mesma forma, e embora haja vestígios de introgressão entre populações das duas subespécies de *C. lusitanica*, separadas pelo vale do rio Mondego, a distribuição, abundância e padrões de dispersão e fluxo génico nesta zona não puderam ser completamente esclarecidos por este trabalho. Assim, tecem-se seguidamente algumas considerações sobre o desenvolvimento de trabalho adicional no sentido de aprofundar o conhecimento da estruturação populacional de *C. lusitanica*.

*Barreiras geográficas e fragmentação do habitat.* Os padrões de diversidade genética observados na parte setentrional da distribuição de *C. lusitanica* sugeriram que os rios Douro e Minho representaram uma barreira no processo de recolonização pós-glacial. No entanto, o efeito de barreira provocado pelos rios não pode ter sido absoluto pois o processo de expansão foi bem sucedido. É um facto que a deriva de larvas, descarregadas de afluentes de montanha nos grandes rios poderá ser um fenómeno comum nesta salamandra (Thiesmeier 1994). Por outro lado, *C. lusitanica* revela excelentes capacidades de movimentação aquática, pelo que salamandras num estado pós-metamorfose poderão conseguir atravessar um rio, de forma accidental ou deliberada. Uma bateria mais alargada de marcadores genéticos seria necessária para investigar os padrões de dispersão em cursos de água de diferente dimensão, quantificando o fluxo génico entre populações ao longo dos cursos de água e, por oposição, o fluxo génico entre populações separadas pelos cursos de água. A utilização de marcadores genéticos com elevada variabilidade, como os microsatélites, permitiriam ultrapassar a redução de poder de análise que se verificou no presente trabalho para *loci* aloenzimáticos e mitocondriais.

*Zona de contacto.* Os padrões de intergradação observados em vários *loci* diagnósticos entre as duas subespécies de *C. lusitanica* sugeriram a ausência de barreiras genéticas à miscigenação. No entanto, o fluxo génico parece ter sido restringido por uma zona de baixa densidade populacional, impedindo níveis maiores de introgressão entre as subespécies. Os padrões geográficos agora observados poderão ser o resultado de sucessivos processos de expansão pós-glacial, não correspondendo a uma dinâmica populacional recente. Esta questão apenas poderá ser respondida através de um estudo detalhado da zona de contacto utilizando marcadores genéticos altamente variáveis (microsatélites). Paralelamente, a construção de um modelo da distribuição local de *C. lusitanica* permitiria efectuar previsões sobre padrões de fluxo génico corrente, gerando hipóteses que seriam testadas pelos padrões de variação genética. O conhecimento detalhado sobre a forma como contacto secundário entre populações de *C. l. lusitanica* e de *C. l. brevitarsis* se processa neste período inter-glacial do

Quaternário será, com certeza, importante para delinear uma estratégia de conservação perene destas duas unidades intraespecíficas de *C. lusitanica*.

*Estudo de padrões de filogeografia comparada na Península Ibérica*

Os efeitos das glaciações do Pleistoceno, produzidos através de fragmentação populacional, isolamento geográfico e diferenciação genética, têm sido descritos para uma grande variedade de organismos, incluindo plantas (Dumolin-Lapègue *et al.* 1997), artrópodes (Cooper *et al.* 1995), peixes (García-Marin *et al.* 1999), anfíbios anuros e urodelos (Highton & Webster 1976; Green *et al.* 1996), répteis (Lenk *et al.* 1999), aves (Zink & Dittmann 1993) e mamíferos (Sage & Wolf 1986). A maior parte dos trabalhos descreve a preservação de níveis elevados de diversidade genética em refúgios localizados em zonas meridionais e a perda de diversidade genética em áreas de localização mais setentrional, recentemente recolonizadas (Larson 1984; Avise 1994; Hewitt 1996, 1999; Taberlet *et al.* 1998). No entanto, poucos estudos têm focado, de forma detalhada, as consequências das alterações climáticas Pleistocénicas na arquitectura genética das espécies no interior das zonas de refúgio do sul da Europa (Ragghianti & Wake 1986; Comes & Abbott 1998). O exemplo de *C. lusitanica* parece evidenciar uma história biogeográfica relativamente inesperada na Península Ibérica. Embora a espécie apresente uma distribuição predominantemente atlântica, a origem das suas populações actuais parece estar fundamentalmente na zona mais meridional da sua distribuição, onde as influências mediterrânicas se fazem já sentir de forma marcada. É interessante verificar, por oposição, que o padrão espacial de variação genética na salamandra comum, *Salamandra salamandra* Linnaeus 1758, parece sugerir a presença de refúgios Pleistocénicos no norte da Península Ibérica (Alcobendas *et al.* 1996; Dopazo *et al.* 1998). A conclusão de que as populações da parte norte da distribuição de *C. lusitanica* se terão originado através de uma expansão recente, não está de acordo com este cenário proposto para *S. salamandra*. Embora os géneros *Salamandra* e *Chioglossa* sejam filogeneticamente próximos (Titus and Larson 1995; Veith *et al.* 1998), representam modelos ecológicos dissemelhantes (Klewen, 1991; Arntzen 1999), pelo que se esperam histórias biogeográficas díspares para aquelas duas espécies na

Península Ibérica. O desafio que se lança é avaliar até que ponto outros organismos, com diferentes requisitos ecológicos e capacidade de dispersão, evidenciarão padrões de fragmentação e dispersão semelhantes aos de *C. lusitanica*.

O número de estudos filogeográficos na Península Ibérica tem aumentado nos últimos anos revelando a existência de subdivisões filogeográficas, crípticas ou não, representando fases diversas de um processo contínuo que é o de especiação. Neste âmbito, salientamos alguns trabalhos realizados em peixes (*Leuciscus sp.*, Brito *et al.* 1997; *Barbus sp.*, Callejas & Ochando 2000; e *Salmo trutta*, García-Marin *et al.* 1999, Weiss *et al.* 2000), em anfíbios (*Alytes sp.*, Arntzen & García-París 1995, Rosa 1995, Fonseca 1999; *Discoglossus sp.*, García-París & Jockusch 1999; *Pelodytes punctatus*, Sánchez-Herráiz *et al.* 2000; *Rana iberica*, Rosa 1995; *Salamandra salamandra*, Alcobendas *et al.* 1996, Dopazo *et al.* 1998, García-París *et al.* 1998; e *Triturus marmoratus*, Froufe *et al.* em preparação), répteis (*Lacerta schreiberi*, Godinho *et al.* submetido; *Podarcis sp.*, Harris & Sá Sousa submetido) e no mamífero *Oryctolagus cuniculus* (Branco *et al.* in press; Ferrand *et al.* submetido). As subdivisões filogeográficas identificadas parecem estar associadas não só alterações ambientais do Pleistoceno mas também com fenómenos mais antigos, do final do Terciário, como, por exemplo, a formação dos grandes eixos fluviais e bacias hidrográficas da Península (e.g. Brito *et al.* 1997; García-París *et al.* 1998; Callejas & Ochando 2000). No entanto, muitos destes trabalhos não abrangem a área total de distribuição das espécies em estudo, não permitindo ainda ter uma perspectiva global dos padrões de diversidade genética e biogeografia histórica daqueles organismos.

A acumulação do conhecimento dos padrões filogeográficos para diferentes organismos na Península Ibérica permitirá a adopção de metodologias de filogeografia comparada. Neste âmbito, dever-se-á optar por uma abordagem integrativa, incluindo informação ecológica e paleoecológica que permita construção de modelos biogeográficos actuais e a simulação de distribuições históricas das espécies, de acordo com os seus requisitos ecológicos, e a sua comparação com os padrões observados de diversidade genética (McGuigan *et al.* 1998; Teixeira 1999; Artigo VI). Esta abordagem integrada poderá ser aplicada

com sucesso a vários organismos como uma ferramenta objectiva e prática para a identificação de centros de diversificação genética intraespecífica e, em particular, zonas de refúgio histórico onde as espécies puderam sobreviver durante períodos com condições ambientais adversas. A sobreposição de modelos integrados de biogeografia histórica para várias espécies poderá então representar uma imagem mais completa dos padrões de diversidade genética na Península Ibérica. Espera-se que a diversidade revelada por esta abordagem tenha implicações profundas para a conservação da biodiversidade nesta região do sul da Europa.

### 5.7. Referências bibliográficas

- Alcobendas M, Dopazo H, Alberch P (1996) Geographic variation in allozymes of populations of *Salamandra salamandra* (Amphibia: Urodela) exhibiting distinct reproductive modes. *Journal of Evolutionary Biology*, **9**, 83-102.
- Arnold ML (1997) *Natural hybridization and evolution*. Oxford Univ. Press, New York.
- Arntzen JW (1999) *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 - Goldstreifensalamander. Pp. 301-321 in: *Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas*. (eds. K. Grossenbacher and B. Thiesmeier). AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Arntzen JW, 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**, 5-34.
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise JC, Ball RM (1990) Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys of Evolutionary Biology*, **7**, 45-68.

- Barbadillo LJ, Lacomba JI, Pérez-Mellado V, Sancho V, López-Jurado LP (1999) *Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias: Guía ilustrada para conocer todas las especies*. Editorial GeoPlaneta S.A., Barcelona, Spain.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 113-148.
- Berli P, Hotz H, Uzzell T (1996) Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for Aegean water frogs. *Evolution*, **50**, 1676-1687.
- Bernatchez L (1995) A role for molecular systematics in defining evolutionary significant units in fishes. *American Fisheries Society Symposium*, **17**, 114-132.
- Branco M, Ferrand N, Monnerot M (2000) Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity*, **85**, in press.
- Brito JC, Brito e Abreu F, Paulo OS, Rosa HD, Crespo EG (1996) Distribution of Schreiber's green lizard (*Lacerta schreiberi*) in Portugal: a predictive model. *Herpetological Journal*, **6**, 43-47.
- Brito JC, Paulo OS, Crespo E G (1998) Distribution and habitats of Schreiber's green lizard (*Lacerta schreiberi*) in Portugal. *Herpetological Journal*, **8**, 187-194.
- Brito RM, Briolay J, Galtier N, Bouvet Y, Coelho MM (1997) Phylogenetic relationships within the genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in Portuguese fresh waters, based on mitochondrial DNA cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **8**, 435-442.
- Brosche KU (1982) Formas periglaciares antiguas en la Península Ibérica. Posibilidades de una consideración climática. *Estudios Geográficos*, **166**, 5-16. CSIC, Madrid.
- Bull, CM (1991) Ecology of parapatric distributions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **22**, 19-36.

- Caccone A, Milinkotovitch MC, Sbordoni V, Powell JR (1997) Mitochondrial DNA rates and biogeography in European newts (genus *Euproctus*). *Systematic Biology*, **46**, 126-144.
- Callejas C, Ochando MD (2000) Recent radiation of Iberian barbel fish (Teleostei, Cyprinidae) inferred from cytochrome b genes. *The Journal of Heredity*, **91**, 283-288.
- Carlin, J. L. (1997). Genetic and morphological differentiation between *Eurycea longicauda longicauda* and *E. guttolineata* (Caudata: Plethodontidae). *Herpetologica* **53**: 206-217.
- Comes HP, Abbott RJ (1998) The relative importance of historical events and gene flow on the population structure of a Mediterranean ragwort *Senecio gallicus* (Asteraceae). *Evolution*, **52**, 355-367.
- Cooper SJB, Ibrahim KM, Hewitt GH (1995) Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology*, **4**, 49-60.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 290-295.
- Dias JMA (1997) Evolução da linha de costa, em Portugal, desde o último máximo glaciário até à actualidade: síntese dos conhecimentos. *Estudos do Quaternário*, **1**, 53-66.
- Dopazo H, Boto L, Alberch P (1998) Mitochondrial DNA variability in viviparous and ovoviviparous populations of the urodele *Salamandra salamandra*. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**, 365-378.
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V, Petit RJ (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, **146**, 1475-1487.

- Ferrand N, Branco M. The evolutionary history of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): major patterns of population differentiation and geographic expansion. *Submetido*.
- Fonseca, A (1999) Filogeografia do sapo parteiro comum *Alytes obstetricans* através da análise do polimorfismo do citocromo b (DNA mitocondrial). *Tese de Mestrado*. Universidade do Porto.
- García-Marín J, Utter FM, Pla C (1999) Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*, **82**, 46-56.
- García-París M, Alcobendas M, Alberch P (1998) Influence of the Guadalquivir river basin on the mitochondrial DNA evolution of *Salamandra salamandra* (Caudata: Salamandridae) from southern Spain. *Copeia*, **1998**, 173-176.
- García-París M, Jockusch EL (1999) A mitochondrial DNA perspective on the evolution of the Iberian *Discoglossus* (Amphibia: Anura). *Journal of Zoology*, **248**, 209-218.
- Godinho R, Paulo OS, Ferrand N, Luís C, Rosa HD, Crespo EG. Genetic characterization of Iberian Schreiber's green lizard (*Lacerta schreiberi*): protein data. *Submetido*.
- Good, D. A. & Wake, D. B. (1992). Geographic variation and speciation in the torrent salamanders of the genus *Rhyacotriton* (Caudata: Rhyacotritonidae). *University of California Publications in Zoology* **126**.
- Green, D. M., Sharbel, T. F., Kearsley, J. & Kaiser, H. (1996). Postglacial range fluctuation, genetic subdivision and speciation in the western North American spotted frog complex, *Rana pretiosa*. *Evolution* **50**: 374-390.
- Gyllensten UB, Wilson AC (1987) Interspecific mitochondrial DNA transfer and the colonization of Scandinavia by mice. *Genetical Research Cambridge*, **49**, 25-29.
- Harris DJ, Sá-Sousa P. Species distinction and relationships of the western Iberian *Podarcis* lizards (Reptilia, Lacertidae) based on morphology and mitochondrial DNA sequences. *Submetido*.

- Hewitt GM (1988) Hybrid zones - natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution*, **3**, 158-167.
- Hewitt GM (1993) After the Ice: *parallelus* meets *erythropus* in the Pyrenees. Hybrid zones and the evolutionary process (Harrison RG, ed.). Oxford University Press, New York.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal Linnean Society*, **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87-112.
- Highton R, Webster TP (1976) Geographic protein variation and divergence in populations of the salamander *Plethodon cinereus*. *Evolution*, **30**, 33-45.
- Hunt WG, Selander RK (1973) Biochemical genetics of hybridisation in European house mice. *Heredity*, **31**, 11-33.
- Klewen R (1991) Die landsalamander Europas: 1. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- Larson A (1984) Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae. *Evolutionary Biology*, **17**, 119-217.
- Larson A, Wake DB, Yanev KP (1984) Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics*, **106**, 293-308
- Lee JC (1993) Geographic variation in size and shape of neotropical frogs: a precipitation gradient analysis. *Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas*, **163**, 1-20.
- Lenk P, Fritz U, Joger U, Wink M (1999) Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). *Molecular Ecology*, **8**, 1911-1922.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.

- McGuigan K., McDonald K, Parris K, Moritz C (1998) Mitochondrial DNA diversity and historical biogeography of a wet forest-restricted frog (*Litoria pearsoniana*) from mid-east Australia. *Molecular Ecology*, **7**, 175-186.
- Maxson LR, Maxson RD (1979) Comparative albumin and biochemical evolution in Plethodontid salamanders. *Evolution*, **33**, 1057-1062.
- Menozzi P, Piazza A, Cavalli-Sforza L (1978) Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science*, **201**, 786-792.
- Moritz C (1994) Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Nevo, E. (1972). Climatic adaptation in size of the green-toad, *Bufo viridis*. *Israel Journal of Medical Science*, **54**, 1010.
- Paetkau D (1999) Using genetics to identify intraspecific conservation units: a critique of current methods. *Conservation Biology*, **13**, 1507-1509.
- Ragghianti M, Wake D (1986) Genic variation and its evolutionary implications in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Herpetologica*, **42**, 206-214.
- Ribeiro O, Lautensach H, Daveau S (1987) *Geografia de Portugal. I. A posição geográfica e o território*. Edições João Sá da Costa. Lisboa.
- Rosa, H. D. (1995). Estrutura e diferenciação genética de populações de anuros da fauna portuguesa. *Tese de Doutoramento*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, **1**, 9-10.
- Sage RD, Wolff JO (1986) Pleistocene glaciations, fluctuating ranges and low genetic variability in a large mammal (*Ovis dali*). *Evolution*, **40**, 1092-1095.
- Sánchez-Herráiz MJ, Barbadillo LJ, Machordom A, Sanchiz (2000) A new species of Pelodytid frog from the Iberian Peninsula. *Herpetologica*, **56**, 105-118.

- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A, Cosson J (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- Tan AM, Wake DB (1995) DNA mitochondrial phylogeography of the California newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **4**, 383-394.
- Tarkhnishvili DN (1994) Interdependences between populational, developmental and morphological features of the Caucasian salamander, *Mertensiella caucasica*. *Mertensiella*, **4**, 315-325.
- Tarkhnishvili DN, Thorpe RS, Arntzen JW (2000) Pre-Pleistocene refugia and differentiation between populations of the Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**, 414-422.
- Teixeira J (1999) Biogeografia de Salamandra-lusitânica: utilização de Sistemas de Informação Geográfica na modelação da distribuição. *Tese de Mestrado*. Universidade do Porto.
- Templeton AR (1998) Nested clade analysis of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**, 381-397.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**, 767-782.
- Thiesmeier B (1994) Trophische Beziehungen und Habitatpräferenzen sympatrisch lebender *Salamandra salamandra* und *Chioglossa lusitanica*-Larven. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde*, **17**, 119-126.
- Thorpe JP (1982) The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **13**, 139-168.

- Titus TA, Larson A (1995) A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary radiation of the salamander family Salamandridae. *Systematic Biology* **44**, 125-151.
- Vences M (1997) *Chioglossa lusitanica* Barboza du Bocage, 1864. Salamandra rabilarga; Salamandra-dourada. In: Pleguezuelos JM (ed.) *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*. Universidad de Granada & A.H.E., Granada, pp 103-105
- Veith M, Steinfartz S, Zardoya R, Seitz A, Meyer A (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.
- Vieira GT, Cordeiro AMR (1998) Geomorfologia periglaciária em Portugal: estado do conhecimento. *Procesos biofísicos actuales en medios fríos*. Publicacions de la Universitat de Barcelona, 347-371.
- Waples RS (1991) Pacific salmon, *Oncorhynchus spp.*, and the definition of 'species' under the endangered species act. *Marine Fisheries Review*, **53**, 11-22.
- Weiss S, Antunes A, Schlötterer C, Alexandrino P (2000) Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmo trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology*, **9**, 691-698.
- Zagwijn WH (1992) Migration of vegetation during the Quaternary in Europe. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, **153**, 9-20.
- Zink RM, Dittmann DL (1993) Gene flow, refugia, and evolution of geographic variation in the song sparrow (*Melospiza melodia*). *Evolution*, **47**, 717-729.

## 6. Conclusões

Este trabalho representa uma contribuição para o conhecimento da história evolutiva do género monoespecífico *Chioglossa*. A descrição dos padrões filogeográficos na salamandra *Chioglossa lusitanica* permitiu construir hipóteses sobre a história das suas populações e a sua história biogeográfica. Neste sentido, o trabalho agora findo procurou também contribuir para o conhecimento mais aprofundado dos padrões biogeográficos da Península Ibérica, podendo representar um modelo para espécies com requisitos ecológicos e capacidade de dispersão semelhantes. Assim, importa realçar de forma mais sintética as seguintes conclusões:

- A diversidade genética revelada por sete *loci* aloenzimáticos em populações de *C. lusitanica* provenientes de toda a sua área de distribuição foi elevada ( $F_{st}=0.68$ ), sendo explicada pela existência de dois grupos populacionais geneticamente diferenciados ( $D_{Nei} = 0.15$ ), localizados a sul (grupo 1) e a norte (grupo 2) do vale do rio Mondego;
- A variação genética ao nível do DNA mitocondrial permitiu detectar dois clados distintos ( $d = 2.2\%$ ) e um padrão geográfico de diversidade genética semelhante ao observado através da variação aloenzimática;
- A variabilidade genética, ao nível dos marcadores genéticos nucleares e citoplasmáticos, revelou um decréscimo significativo para norte do rio Mondego, geograficamente associado aos rios Douro e Minho;
- Em populações de áreas adjacentes ao vale do rio Mondego, foi detectado um padrão de intergradação para *loci* nucleares e mitocondriais diagnósticos entre populações do grupo 1 e populações do grupo 2, sugerindo contacto entre populações geneticamente diferenciadas;

- A concordância observada na distribuição geográfica de variação genética nuclear e mitocondrial, em conjunto com os níveis de diferenciação observados, sugerem que os padrões actuais de diversidade genética de *C. lusitanica* reflectem dois processos evolutivos distintos: (i) uma fragmentação Pleistocénica no sul da distribuição da espécie provocando a diferenciação de dois grupos populacionais; e (ii) uma expansão geográfica pós-Pleistocénica que resultou (a) numa redução da variabilidade genética para norte do rio Douro e (b) num aumento da variabilidade genética na zona do rio Mondego através de contacto secundário entre populações geneticamente diferenciadas.

- A análise paralela de variação morfológica em *C. lusitanica* permitiu revelar padrões geográficos concordantes com a variação genética entre o grupo 1 e o grupo 2, com o comprimento relativo dos dígitos a ser menor em salamandras de populações localizadas a sul do Mondego. No entanto, o nível global de diferenciação morfológica em *C. lusitanica* foi comparativamente reduzido entre os dois grupos populacionais geneticamente diferenciados;

- A integração da modelação ecológica da distribuição da espécie e de mapas sintéticos da diversidade genética permitiu detectar áreas historicamente diferentes para *C. lusitanica*. A diversidade genética da espécie encontra-se assimetricamente distribuída, com a zona meridional da distribuição da espécie, a sul do rio Douro, contendo 95% da diversidade genética observada. Dentro desta área, existem dois núcleos populacionais que representam populações historicamente isoladas. Conclui-se que esta área deverá ser prioritária para a conservação da espécie, e propõe-se que sejam reconhecidas duas “Unidades Evolutivas Significativas” (“Evolutionary Significant Units” – ESUs) para a conservação da espécie.

- Considerando a longa história de evolução independente sugerida pela diferenciação genética entre duas unidades populacionais de *C. lusitanica*, o padrão de introgressão espacialmente limitado e variação morfológica concordante com a variação genética observada, propõe-se o reconhecimento de duas subespécies distintas para a espécie: *C. l. lusitanica* e *C. l. brevitarsis*.