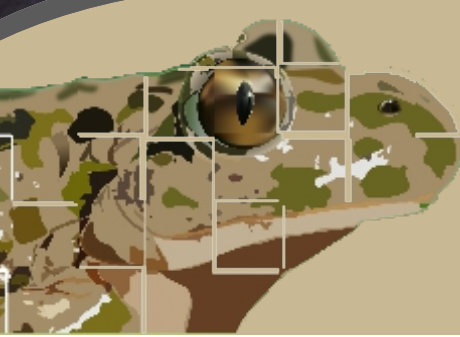


HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (*Pelodytes spp.*) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA: Filogenia, filogeografía y patrones de genética de poblaciones inferidos a partir de la variación en el ADN mitocondrial, nuclear y microsatélites

Francisco Jesús Díaz Rodríguez

Directores: Miguel Tejedo Madueño y Helena Gonçalvez

Tutor: Alfredo E. Rubio Casal



TESIS DOCTORAL

Universidad de Sevilla

Doctorado en Biología de la Conservación

diciembre 2015



**HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS
(*Pelodytes spp.*) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA:
Filogenia, filogeografía y patrones de genética de
poblaciones inferidos a partir de la variación en el
ADN mitocondrial, nuclear y microsatélites**

Francisco Jesús Díaz Rodríguez

TESIS DOCTORAL

Universidad de Sevilla, Facultad de Biología

Directores **Miguel Tejedo Madueño**
de tesis: **María Helena Aguiar Gonçalvez**

Tutor de tesis: **Alfredo E. Rubio Casal**
Departamento: **Biología Vegetal y Ecología**
Programa de Doctorado: **Biología de la Conservación**

Sevilla, diciembre de 2015



*A mi hijo, Leo
por permitirnos crecer
nuestro árbol de la vida
juntos, a lomos del
segundo caballo.*

En Tassili y otras comarcas del Sáhara, las pinturas rupestres nos ofrecen, desde hace unos seis mil años, estilizadas imágenes de vacas, toros, antílopes, jirafas, rinocerontes, elefantes... ¿Esos animales eran pura imaginación? ¿O bebían arena los habitantes del desierto? ¿Y qué comían? ¿Piedras? El arte nos cuenta que el desierto no era desierto. Sus lagos parecían mares y sus valles daban de pastar a los animales que tiempo después tuvieron que emigrar al sur, en busca del verdor perdido.

Eduardo Galeano. *Espejos*

"The affinities of all the beings of the same class have been represented by a great tree... The buds give rise to growth to fresh buds, and these if vigorous, branch out and overtop on all sides many a feebler branch, so By generation I believe it has been with the great Tree of Life, which fills with its dead and broken branches the crust of the earth, and covers the surface with its ever branching and beautiful ramifications."

Charles Darwin, 1859

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda y experiencia de un grupo de personas que trabajan constantemente para que investigadores y doctorand*s puedan llevar adelante sus experimentos. Quiero dar las gracias a todo el personal del Laboratorio de Ecología Molecular de la EBD (Estación Biológica de Doñana) en Sevilla y al personal del CTM (Centro de tests moleculares) del CIBIO en Oporto. El análisis de laboratorio no sería posible sin un trabajo de previo, por ello debo dar las gracias a I. Martínez-Solano, F. Sequeira, M. Vences y a mis directores M. Tejedo y H. Gonçalves por su dedicación. Aunque el trabajo de campo es tan duro como gratificante, sin duda, fue de ayuda inestimable contar con el apoyo de un número interesante de personas que, la mayoría de ellas de forma desinteresada, empujaron el carro cuando se atascó. Quien haya muestreado alguna vez *Pelodytes* sabe lo que quiero decir. Agradezco haber compartido muestras con: E. Ayllón, J. A. M. Barnestein, B. Estanque, E. Gomes, J. P. González, M. Katzenberger, I. Martínez-Solano, A. Montori, N. Oromí, R. Rebelo, M. A. Romeo Lafuente, J. Teixeira y W. de Vries. Muchas de las muestras provienen de museos y colecciones, agradezco a Teresa García Díez, Eva Albert, J.W. Arntzen, Miguel Ángel Carretero, Daniele Canestrelli, Philippe Geniez, Thibaut Couturier, Eduardo G. Crespo, Michel Domínguez y Luis Ceríaco. Y como no puede ser de otra manera, tengo que agradecer también a todas las personas que han compartido generosamente conmigo su tiempo durante tantos kilómetros de búsqueda "incansable": S. Cano, A. Carta, F. Ceacero, A. Cordero, D. Donaire, L. García, R. de la Fuente, A. Luque, A. Rodríguez de Austria, M. Jowers, G. Schreur, E. Dimitriadi, A. Theodoridou, J. Xau y sobre todo a G. Dimuro por su ánimo y paciencia durante los últimos meses. Sin ell*s, nunca habríamos llegado tan lejos. Agradezco también las fotos amablemente cedidas por P.A. Crochet, A. Sánchez Vialas, Godfried Schreur y Ana Cordero; a R. D. Randrianiaina por la ayuda en la descripción de las larvas; a E. Matheu, Richard G. Bowker y A. González (Fonoteca Zoológica) haber compartido grabaciones de cantos con nosotros; al personal del Cibio (especialmente a Sarita y Teresa) y de la EBD, especialmente al personal de seguridad (Enrique) y de administración (Carmen Moro) que realiza eficiente labor. Y como no a los colegas de despacho: Airam Rguez., David Canal, Marco Katzenberger, Helder Duarte, Luis Miguel Gutierrez, José Sarasola y Carlos Camacho por su compañía y disponibilidad durante tantas horas. Especialmente, quiero dar las gracias a Miguel Ángel Carretero, Xavi Santos, F. Martínez-Freiría, Fernando Sequeira y al pollo al ajillo de Kike García, que me han levantado el ánimo cuando más falta me hacía. Gracias a ellos, los momentos de desánimo y "desamparo científico" en los que se encuentra habitualmente el doctorando, con más llevaderos. Esta

aventura habría tenido otro final si no es por el último tramo en el que me han acompañado Glenda y Graçaliz Dimuro, mi agradecimiento especial para ellas por el apoyo moral y logístico. Finalmente quiero dar las gracias a mi amor, Glenda porque con su cariño, comprensión y temple me ha enseñado lo maravillosa que puede ser la vida y porque, fruto de este amor, ha traído al mundo, de la manera más generosa y valiente que nunca he visto, un regalo para toda la vida: Leo, una nueva personita que ya está compartiendo su camino junto a nosotras y que, sin duda, es quien me ha aportado la fuerza final para comenzar un nuevo ciclo.

La presente tesis doctoral se organizó en un periodo de muestreo entre España y Portugal y otro de análisis que se realizó en la Estación Biológica de Doñana (C.S.I.C) (España) y el Centro de Investigación en Biodiversidad y Recursos Genéticos (Cibio) de la Universidad de Oporto (Portugal) y se enmarcó dentro de los programas de ayudas predoctorales de formación del personal investigador financiados por la FCT (Fundación para la Ciencia y Tecnología de Portugal) (SFRH/BD/70631/2010) y el CSIC (Ministerio de Ciencia e Innovación) CGL2005-02931/BOS.

Resumen

La familia Pelodytidae, es un grupo relictivo de anuros primitivos presentes en la región Paleártica, constituido por un único género (*Pelodytes*) que comprende en la actualidad tres especies. Los análisis sobre la divergencia genética, morfológica y bioacústica de las poblaciones distribuidas dentro de la Península Ibérica plantean que la diversidad dentro del grupo podría estar subestimada. En esta tesis, tratamos de esclarecer los procesos evolutivos, históricos y contemporáneos, que determinan los patrones actuales de variación del género en Europa Occidental. Usando el análisis basado en un modelo de coalescencia mediante una aproximación multilocus, mitocondrial y nuclear, recuperamos cuatro unidades evolutivas principales, bien soportadas y delimitadas, que exhiben historias demográficas contrastadas, indicando trayectorias evolutivas independientes. La estructura genética es coincidente entre los individuos en el análisis nuclear de agregación bayesiana de marcadores de evolución lenta y rápida (microsatélites). A excepción de un número limitado de individuos, localizados en los límites geográficos de sus distribuciones y pertenecientes a estrechas zonas de contacto secundario, todos los individuos analizados genéticamente son perfectamente identificables, de forma fiable y sin ambigüedad, a cada uno de los linajes, principal criterio de especiación. En consecuencia, la Península Ibérica cuenta con los mayores índices de biodiversidad conocidos hasta la fecha para la familia y un nivel de complejidad taxonómica mayor que el propuesto en la actualidad, con tres endemismos con distribución exclusivamente ibérica, dos de ellos descritos en esta tesis: *Pelodytes ibericus*, Sánchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom & Sanchíz, 2000, en el sureste de Portugal y suroeste de España; *Pelodytes atlanticus* en localidades a lo largo de la costa atlántica y centro de Portugal y *Pelodytes hespericus* en la zona centro y levante española, intercalado en los rangos de distribución de *Pelodytes ibericus* y *P. punctatus*. Esta última incluye el área de la localidad tipo ("aux alrededores de Beauvais", Departamento Oise, al norte de Francia: Daudin, 1802) y todas las poblaciones al norte de los Pirineos dentro dos sublinajes, uno que se distribuye ampliamente, desde Cataluña hasta el norte de Francia, y otro restringido al sur de Francia y norte de Italia. Cómo en otros taxones ibéricos, la distribución de la variación genética en el género responde a un patrón filogeográfico resultado de una divergencia ocurrida en refugios separados durante largos periodos glaciales. El proceso de fragmentación y aislamiento de las poblaciones, sufrido probablemente en repetidas ocasiones a lo largo del Plioceno y Pleistoceno, sería el origen de la separación este-oeste entre los distintos linajes en la península. Con el objetivo de explorar los patrones de mezcla y contrastar estos resultados, se analizaron los niveles de hibridación y estructura genética en poblaciones pertenecientes a los tres endemismos en dos áreas de contacto secundario del sur de la Península, observándose una barrera al flujo génico, con un patrón claramente desigual entre unas especies y otras. Aunque en ambas existe introgresión, debida principalmente a la dispersión de las hembras sobre los machos, entre *P. atlanticus* y *P. ibericus* hay una zona de tensión, a pesar de que el aislamiento reproductivo entre los linajes no se ha completado, con barreras al flujo génico promovidas por factores intrínsecos; mientras que entre *P. ibericus* y *P. hespericus*, existe una barrera importante al flujo de genes debida principalmente a factores abióticos asociados con el hábitat ecológico.

Palabras clave: *especiación, especies crípticas, pelodytes atlanticus sp. nov., pelodytes hespericus sp. nov., península ibérica, zona híbrida.*

Abstract

The Pelodytidae family are a relict group of primitive frogs, consisting of a single genus (*Pelodytes*) comprising currently three species in the Western Palearctic region, although analysis of genetic, morphological and bioacústica divergence of populations distributed within the Iberian Peninsula suggest that the diversity within the group could be underestimated. In this thesis, we try to elucidate the evolutionary, historical and contemporary processes that have determined the current patterns of variation of the genre in Western Europe. Using a model of coalescence by a multilocus approach, based on mitochondrial and nuclear markers, we recovered four well supported and enclosed main evolutionary units exhibiting contrasted demographic stories. The genetic structure is coincident among the individuals both in the analysis of Bayesian aggregation of nuclear genealogies and markers of rapid development (microsatellite). Except for a limited number of individuals, located within the geographical limits of their distributions and belonging to narrow areas of secondary contact, all analyzed individuals are perfectly identifiable, reliably and unambiguously, to each of the lineages, indicating independent evolutionary paths, which is the main criterion for speciation by most authors. Consequently, the Iberian Peninsula has the highest rates of biodiversity known to date for the family, and a higher taxonomic level of complexity than the proposed today, with three endemic species: *Pelodytes ibericus*, Sanchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom & Sanchíz, 2000, which is distributed exclusively in the south, with species in southeast Portugal and southwestern Spain; *Pelodytes atlanticus*, in localities along the Atlantic coast and central Portugal, and *Pelodytes hespericus*, in the Spanish center-lift, interspersed in the distribution ranges of *P. ibericus* and *P. punctatus*, which includes the area of the locality of the type ("aux alentours de Beauvais", Department Oise, north of France: Daudin, 1802) and all populations on the north of the Pyrenees. The latter would be made up of two sub-lineages, one of which is widely distributed, from Catalonia to northern France, and one restricted to southern France and northern Italy. As in other Iberian taxa, the distribution of the genetic variation in the genus responds to a defined Phylogeographical pattern, the result of a divergence occurred in separate shelters for long glacial periods. The process of fragmentation and isolation of the populations, probably suffered repeatedly throughout the Pliocene and Pleistocene, would be the origin of the East-West separation among the different lineages in the peninsula. In order to explore these mixing patterns and to contrast the previous results, we analyzed the levels of introgression and gene structure among populations belonging to the three endemic species in two areas of secondary contact in the south of the peninsula, showing a barrier to gene flow, with a clearly uneven pattern between some species and others. Although there is dispersion in both species, due to mainly the dispersion of females on males, between *P. ibericus* and *P. atlanticus* there exist barriers to gene flow of genetic origin, promoted by intrinsic factors, although the reproductive isolation between the lineages is not completed, while there is a significant barrier to gene flow between *P. hespericus* and *P. ibericus*, mainly due to abiotic factors associated with the ecological habitat.

Keywords: *criptic species, hybrid zone, Iberian Peninsula, pelodytes atlanticus sp. nov., pelodytes hespericus sp. nov., speciation.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
1. Introducción general e hipótesis de partida	11
2. Antecedentes de la investigación	13
Los conceptos de especie y diversidad biológica en el estudio de la evolución	13
La influencia del Mediterráneo en la historia evolutiva de las especies	15
Causas y consecuencias genéticas del proceso evolutivo de diferenciación	18
El papel de la filogeografía en el estudio de la diversidad biológica	19
El papel de la Península Ibérica en los estudios filogeográficos	22
Ventajas e inconvenientes del uso de marcadores genéticos en los estudios filogeográficos	23
3. Justificación de la investigación	28
Justificación de la elección del modelo de estudio.....	28
Familia Pelodytidae	29
4. Objetivos y organización de la tesis	33
Objetivos de la Tesis Doctoral	33
Organización general de la Tesis Doctoral.....	34

CAPÍTULO 1: Evidencia molecular de especies candidatas crípticas en los *Pelodytes* ibéricos

1. Introduction	44
2. Material and methods	45
2.1. Sampling and DNA extraction	45
2.2. Molecular markers, amplification and sequencing.....	45
2.3. Lineage identification and delineation	46
2.4. Validation approach	48
3. Results	49
4. Discussion	51

CAPÍTULO 2: Taxonomía de cara a la especiación críptica: integración de datos moleculares, bioacústicos y morfológicos revelan dos nuevas especies de *Pelodytes* en la Península Ibérica

1. Introduction	68
2. Material and methods	71
2.1. Fieldwork, sampling and external morphological measurements	71
2.2. Bioacoustic analysis	72
2.3. Molecular markers and laboratory work	74
2.4. Species delimitation	76
2.5. Species tree analysis	77
3. Results and Discussion	78
3.1. DNA sequences and genetic diversity	78
3.2. Mitochondrial differentiation	78
3.3. Molecular species delimitation based on nuclear DNA	79
3.4. Morphological differentiation	80
3.5. Bioacoustic differentiation	81
3.6. Species tree analysis.....	82
3.7. Integrative species delimitation	83
3.8. Considering all the available evidence, should the lineages of <i>Pelodytes</i> occurring in the Iberian Peninsula be recognized as different species?	85
3.9. Evolution of western Palearctic Parsley frogs	86

4. Taxonomy	88
4.1. <i>Pelodytes punctatus</i> (Daudin, 1802)	88
4.2. <i>Pelodytes ibericus</i> (Sánchez-Herraíz, Barbadillo-Escrivá, Machordom, and Sanchíz, 2000)	90
4.3. <i>Pelodytes atlanticus</i> sp. nov.	93
4.4. <i>Pelodytes hespericus</i> sp. nov.	95

CAPÍTULO 3: Análisis genético de dos zonas de contacto secundario entre *P. atlanticus*, *P. ibericus* y *P. hespericus* en el sur de la Península Ibérica145

1. Introducción	148
2. Material y métodos	150
2.1. Diseño de muestreo y trabajo de laboratorio	150
2.2. Análisis de variación mitocondrial	152
2.3. Análisis de la variación nuclear en marcadores de evolución rápida: microsatélites	153
2.4. Análisis de clinas genéticas	155
3. Resultados	156
3.1. Resultados del análisis de diferenciación en secuencias mitocondriales	156
3.2. Resultados del análisis de marcadores de evolución rápida: microsatélites	157
3.3. Resultados del análisis de estructura poblacional	158
3.4. Análisis clinal	160
4. Discusión	161
4.1. Descripción e identificación de las zonas de contacto	162

DISCUSIÓN GENERAL.....185

CONCLUSIONES203

INTRODUCCIÓN

Introducción general e hipótesis de partida

La evolución es, ante todo, un proceso de cambio. Hoy, como en tiempos de Charles Darwin, la evolución de los seres vivos sigue siendo una fuente inagotable de luz sobre la historia y el origen de la vida en nuestro planeta. El estudio histórico de la distribución de los seres vivos y las relaciones que se establecen entre ellos a nivel genético, poblacional y ecológico adquieren una nueva perspectiva cuando son enfocadas desde un punto de vista evolutivo (Futuyma, 1998). En biología nada tiene sentido, si no es a la luz de la evolución (Dobzhansky, 1973). Pero ¿qué factores son los responsables del cambio evolutivo y cuáles son sus efectos? Las respuestas a esta pregunta pueden abordarse desde múltiples perspectivas.

Como en otras ciencias biológicas, los pilares sobre los que se asienta la filogeografía, se remontan al nacimiento de la Teoría Evolutiva, como el mismo Darwin apuntaba en 1859 en la introducción a la primera edición de “El origen de las Especies”: “Mientras viajaba a bordo del buque de guerra inglés Beagle, en calidad de naturalista, llamaron mucho mi atención ciertos hechos que observé en la distribución geográfica de los seres orgánicos que habitan en América del Sur y en las relaciones geológicas entre los actuales habitantes y los pasados en aquel continente. Estos hechos, como se verá en los últimos capítulos de este volumen, parecían arrojar alguna luz sobre el origen de las especies, el misterio de los misterios, como ha denominado uno de nuestros más grandes filósofos” (se refiere al “Ensayo sobre el Principio de la Población” de Thomas Malthus). Al margen de sus connotaciones culturales y filosóficas, desde un punto de vista puramente científico, la teoría de la evolución sirve de punto de partida y marco de referencia para el estudio de la diversidad biológica existente.

Los trabajos de Alfred Wallace (1958) y Charles Darwin (1959) introdujeron en paralelo un nuevo concepto al asumir que sin variación no puede haber evolución, pues justamente sobre ella opera la selección natural. La selección natural es un mecanismo, no el único, que explica la enorme biodiversidad actual, permitiendo a los seres mejor adaptados al entorno en el que viven dejar más descendencia pero, al mismo tiempo, asegurando a través de la variabilidad existente, la supervivencia ante los posibles cambios de ese entorno. El proceso de adquisición de nuevos atributos puede ser constante y/o gradual, pero los cambios evolutivos (y el proceso por el que un linaje antecesor se divide en linajes independientes) se producen con relativa rapidez, acelerados por las circunstancias que los provocan en la mayoría de las ocasiones, y en episodios de tiempo cortos y poco frecuentes (Gould, 1972). La capacidad de adaptarse a los cambios, sobre todo cuando estos son bruscos, es un valor potencial, desde un punto de vista evolutivo, que se pone a prueba cuando estos se producen.

Esta capacidad de resiliencia puede dotar a las poblaciones y a las especies de ciertas ventajas evolutivas o puede ser, forzosamente, la única opción que les permita sobrevivir a los impactos derivados de determinados cambios o perturbaciones (sean ambientales o bióticas). Si tenemos en cuenta que la capacidad de adaptarse está directamente relacionada con la riqueza y diversidad genética, capaz de producir una variedad de fenotipos y de dotar a los organismos de cierta versatilidad plástica o adaptativa, entonces las especies sin estas características no sobrevivirán. O lo que es lo mismo, las especies con poca riqueza genética tienden a desaparecer.

Siguiendo los pasos del principio de falsabilidad que propuso Karl Popper en “La Lógica de la Investigación Científica” (*Logik der Forschung*, 1934), la mejor prueba para contrastar esta hipótesis sería tratar de encontrar un sistema de organismos poco diverso, desde el punto de vista genético, que se haya enfrentado con éxito a grandes obstáculos a lo largo del proceso evolutivo. Si el éxito evolutivo de una especie consiste en la capacidad de sobrevivir a los cambios que se producen en su entorno, y las especies con más éxito son aquellas que han enfrentado más y mayores cambios, podemos inferir que las especies con más diversidad genética serán las que han superado un número considerable de obstáculos a lo largo de un periodo evolutivo de existencia amplio.

En la presente tesis doctoral, partiendo del eje hipotético descrito, centraremos nuestro estudio en la historia evolutiva de los sapillos moteados en la Península Ibérica, un taxón ancestral de arqueobatracios o anfibios primitivos, a través de la filogenia, filogeografía y los patrones de genética de poblaciones inferidos a partir de la variación en el ADN mitocondrial, nuclear y microsátélites. La familia Pelodytidae es uno de los principales grupos de anuros vivientes más primitivos que se conocen, con un complejo registro fósil que abarca desde finales del Jurásico al Mioceno en América del Norte (Sanchiz, 1998a) y del Eoceno al Holoceno en Europa (Henrici, 2000; Roček y Rage, 2000; Sanchiz, 1998a) y que en la actualidad comprende un único género, *Pelodytes*, con solo tres especies relictas y restringidas a la región del Paleártico Occidental. Nuestra hipótesis principal de partida será la siguiente:

Dado el relativamente largo periodo evolutivo recorrido por el organismo modelo de nuestro estudio y la entidad de los eventos acaecidos en la región a lo largo del pasado, una aproximación evolutiva a los patrones de variación genética y estructura poblacional nos permitirá explorar el actual grado de diversidad dentro de las dos especies que cohabitan la Península Ibérica, *P. punctatus* y *P. ibericus*, y contrastar el escaso número de representantes taxonómicos existente.

A pesar de la historia de la familia Pelodytidae, la exigua diversidad actual puede obedecer, bien a la pérdida de linajes antepasados, producida por eventos de extinción a lo largo de su extenso periodo evolutivo, como parece indicar la existencia de taxones fósiles (*P. arevacus*) (Sanchiz *et al.* 2002), bien a que la diversidad presente permanece oculta de manera críptica, o bien a ambas circunstancias. El proceso de diferenciación es complejo y puede presentar aceleraciones o

ralentizaciones en la aparición de cambios morfológicos que nos permiten distinguir especies fácilmente, en base a caracteres secundarios de especiación (de Queiroz, 2007), o por el contrario, que nos impiden identificar linajes evolutivos independientes a pesar de estar presentes. Estos cambios en el proceso de diferenciación, pueden manifestarse en discordancias entre la velocidad de cambio de caracteres genéticos y fenotípicos, principalmente morfológicos, lo que se traduce en la aparición de cambios morfológicos rápidos en el seno de algunos grupos poblacionales o, por el contrario, en fenómenos de estasis morfológica a lo largo de procesos de especiación antiguos. En el primer caso, nos encontramos con una incipiente diferenciación genética que da lugar a radiaciones adaptativas (Rundle y Nosil, 2005; Schluter, 2009); mientras que en el segundo, resulta invariablemente en la aparición de especies crípticas (Sturmbauer y Meyer, 1992; Bickford *et al.*, 2007). Este caso, la aparición de especies crípticas originadas a consecuencia de un periodo de aislamiento reproductivo prolongado, se manifiesta principalmente por la existencia de linajes evolutivos independientes y es un fenómeno muy extendido en la naturaleza que afecta a numerosos grupos taxonómicos y que tiene, según los indicios, una incidencia real importante en las estimas de biodiversidad (Wake *et al.*, 1983; Jarman y Elliot, 2000; Pfenninger y Schwenk, 2007). Sin embargo, la importancia de su contribución no ha sido estudiada a la par que las radiaciones evolutivas, aunque ambas parecen intervenir en el origen de la diversidad actual.

Si en base a nuestra hipótesis, demostramos que, dentro del grupo que nos ocupa, la existencia de elevada variabilidad, del tipo que fuere (genética, morfológica, ecológica y/o comportamental, etc.), está marcada por patrones filogeográficos independientes fruto de procesos de especiación crípticos, deberá considerarse una señal inequívoca de que la diversidad dentro del sistema en estudio se encuentra subestimada. De lo contrario, alguna de las premisas de partida será errónea y nuestra hipótesis, deberá ser refutada.

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Los conceptos de especie y diversidad biológica en el estudio de la evolución

Desde el punto de vista del pensamiento científico, existen dos premisas de las que depende “el problema de entender el mundo, incluidos nosotros y nuestro conocimiento como parte de él”, tal y como define Karl Popper en su visión holística epistemológica (1991). La primera es que las observaciones dependen de la teoría. Antes de aceptar las observaciones del telescopio se debe mirar la óptica del telescopio, el modo en que está montado, con el fin de asegurar que el telescopio está apuntando en la dirección correcta y que la luz viaja a través del espacio en línea recta. El segundo es que la evidencia, por sí sola, es insuficiente para determinar qué teoría es correcta. Al igual que los

prisioneros en la alegoría platónica del “mito de la caverna”, las características de las especies que percibimos son solo sombras. Si queremos conocerlas realmente, necesitamos recurrir a ideas y conceptos, salir de la caverna. Si, usando este razonamiento señalado en la teoría de las ideas (Fedón, Platón), aplicamos el núcleo de la filosofía clásica a la delimitación de las especies, debemos ser partícipes del concepto de especie perteneciente al mundo inteligible, que no se percibe fácilmente por los sentidos. Al basarnos exclusivamente en el estudio de las propiedades adquiridas durante el transcurso de la evolución, cometemos un error inherente pues dichas propiedades proceden de la gran variedad existente en el mundo sensible.

El concepto biológico de especie es una de las ideas clave en biología evolutiva. Cuando miembros de dos poblaciones tienen la oportunidad de encontrarse en la naturaleza en condiciones adecuadas para que tenga lugar el reconocimiento mutuo y la reproducción y, además, están aislados reproductivamente de otros grupos afines, estamos hablando biológicamente de especie (Mayr, 1942). Considerar evolutivamente una especie implica, además de asumir que se trata de una población natural de individuos reproductivamente aislados por barreras de carácter biológico, mantener una identidad frente a otras con un origen independiente (Wiley, 1978), constituyendo un linaje evolutivo separado. Los nuevos desarrollos en el estudio de la evolución tienen que ver con este concepto y con la aceptación generalizada de la definición de Queiroz (1998, 2007). El estudio de las especies como “linajes independientes que evolucionan por separado” reconoce un periodo de existencia suficiente que les haya permitido diferenciarse y adquirir propiedades emergentes a lo largo del desarrollo evolutivo. Según esta definición, que las especies pertenezcan a categorías delimitadas por atributos o criterios secundarios de especiación, no constituye una razón, en absoluto, determinante. Sin embargo, las características adquiridas en el transcurso de la evolución por linajes que se desarrollan independientemente son relevantes porque evidencian dicha separación.

Cuando hablamos de especies, por tanto, nos referimos indirectamente al tiempo evolutivo y a la capacidad de reproducirse. En el primer caso, la interacción génica puede verse interrumpida cuando dos poblaciones biológicas se desarrollan independientemente, en lugares separados o no, el tiempo necesario durante el cual se acumulan características diferentes y estas se fijan en las poblaciones. Las nuevas mutaciones surgidas en este proceso pueden provocar incompatibilidades entre los genes responsables de la diferenciación ecológica, fisiológica y/o comportamentales, que se pone de manifiesto cuando las poblaciones diferenciadas se reencuentran y tratan de reproducirse entre sí (Coyne y Orr, 2004). La capacidad de que especies pertenecientes a linajes evolutivos independientes, tengan o no características similares, puedan convivir en simpatria y permanecer como especies distintas, es el único test objetivo de especiación (Jiggins y Mallet, 2000).

Por otro lado, el concepto de biodiversidad fue ya apuntado por la propia teoría de la evolución de Darwin. La diversidad biológica actual es el resultado de la evolución de los seres vivos sobre el

planeta y de los factores externos que han permitido su diversificación y continuidad. Los patrones que conforman estos procesos actúan constantemente sobre genes, especies y ecosistemas. Sin embargo, el concepto biodiversidad, por su carácter intuitivo, ha presentado ciertas dificultades para su definición precisa y el abuso en su empleo puede vaciarlo de contenido (Martín Piera, 1991).

Se distinguen habitualmente tres niveles de diversidad biológica:

- Genética o diversidad intraespecífica de los genes y de su distribución,
- Específica, entendida como diversidad de los genomas que distinguen a las especies.
- Ecosistémica, la diversidad de las comunidades biológicas cuya suma integrada constituye la biosfera.

A lo largo de esta tesis cuando nos usemos “diversidad”, nos referiremos indistintamente a las dos primeras, mientras que cuando hablemos de biodiversidad será exclusivamente haciendo referencia a la segunda definición en términos cualitativos, no cuantitativos, de variedad de especies.

La influencia del Mediterráneo en la historia evolutiva de las especies

La región Euroasiática acoge dos áreas de gran riqueza biológica y altos niveles de endemismos¹: la cuenca del Mediterráneo y la región del Cáucaso. El Mediterráneo, es considerado, en su conjunto, uno de los 25 puntos calientes o “*hotspots*” de biodiversidad del planeta (Myers *et al.*, 2000). Son diversos los factores que lo convierten en una región excepcionalmente rica en términos de diversidad biológica y comprenden aspectos como la geología, ecología, biogeografía e historia. Cualquier intento de interpretar patrones biogeográficos requiere una investigación de las dinámicas pasadas a escalas de tiempo y espacio adecuadas.

De los procesos históricos que han influenciado la diversidad biológica actual en las zonas templadas, los cambios climáticos cíclicos u oscilaciones de Milankovitch (Milankovitch, 1941) son probablemente los procesos ambientales más importantes ocurridos durante el Cuaternario llegando a afectar profundamente la distribución de la variación genética (Hewitt, 2000). Hace cuarenta años, el estudio del movimiento de translación del planeta reveló que las oscilaciones en la órbita terrestre han sido una de las causas fundamentales de las alteraciones climáticas del Cuaternario (Hays *et al* 1976). Esto unido a un proceso de retroalimentación en el planeta provocó repetidos episodios de enfriamiento conocidos como edades de hielo o glaciaciones. Durante estos periodos hubo un descenso generalizado de las temperaturas que desencadenó cambios en cascada con repercusión en todo el planeta: se expandieron los hielos desde los polos hacia el Ecuador, lo que originó un descenso del nivel del mar de alrededor 120 m. (abriendo zonas de paso entre continentes e islas) y un descenso

¹ Endemismos son aquellas especies exclusivas de un lugar o área geográfica concreta.

de las cotas de nieve y hielos en todos los sistemas montañosos continentales. Aunque las fluctuaciones climáticas comenzaron durante un periodo anterior, el Plioceno, la primera gran capa de hielo en el hemisferio Norte comenzaría a crecer alrededor de hace 2,5 millones de años y los mayores episodios de oscilación climática ocurrieron sobre todo durante el Pleistoceno con un ciclo dominante de 100.000 años (Webb y Bartlein, 1992), siendo las principales denominadas en Eurasia como Günz (600-500 ka), Mindel (450-350 ka.), Riss (200-135 ka.) y Würm (120-18 ka.) (ka = miles de años antes del presente). El Cuaternario debió ser probablemente, para las regiones dominadas por el hielo, una época fría interrumpida periódicamente por eventos cálidos catastróficos, las breves interglaciaciones, con climas similares al actual (Davis, 1976). Por consiguiente, la relativa estabilidad climática registrada durante los últimos 8000 años parece ser la excepción que confirma la regla. Los patrones biogeográficos actuales pertenecen a un período interglacial poco común en la historia reciente de Europa. El área mediterránea fue mucho más extensa y sus características biogeográficas más complejas de lo que son en la actualidad, como resultado de la bajada del nivel del mar, entre 100 y 150 m., por el intenso secuestro de agua dentro de las grandes masas de hielo. Aunque el tipo de clima mediterráneo, tal y como se conoce en la actualidad, se estableció hace alrededor 3,2 millones de años, época clave en la Península Ibérica como veremos más adelante, esta larga serie de fluctuaciones climáticas ocurridas en el pasado, condicionó notablemente la vida bajo su influencia, afectando de manera decisiva en la composición y distribución de las especies y las comunidades biológicas de la región.

En general, se viene considerando que las edades de hielo tuvieron una influencia notable en la estructura genética de las poblaciones y en la supervivencia de las especies de todo el mundo (ver Hewitt 2000). Existen pruebas aportadas por una gran diversidad de estudios (paleobotánicos, paleontológicos, palinológicos y paleolimnológicos) que revelan la naturaleza transitoria del ambiente y los profundos cambios sucedidos a lo largo del tiempo geológico. Los análisis de los depósitos de polen fósil muestran que, incluso durante los periodos glaciales más severos, existieron diversos refugios que acogieron gran cantidad plantas y animales en la cuenca mediterránea. La permanencia en ellos a largo plazo, cambió la estructura de las comunidades, alterando de forma notable la evolución posterior de cada especie. En Europa, las condiciones frías y secas que caracterizaron los períodos glaciales del Pleistoceno, dieron lugar a la contracción de los rangos de distribución de las especies hacia las regiones del sur, debido al avance de la capa de hielo desde las latitudes más altas (Hewitt, 1996; 1999; 2000). Los periodos glaciales provocaron la mezcla de muchas comunidades, especialmente sobre la fauna debido a su capacidad elevada de dispersión. Por ejemplo, en los depósitos de fauna fósil en el sur de Francia que datan de la fase más severa de la glaciación de Würm (hace unos 80.000 años), se encuentran especies de distribución nórdica, tan dispares como el búho nival (*Nyctea scandiaca*) o el reno (*Rangifer tarandus*), y especies mediterráneas termófilas, como la tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*). Esto indica que las condiciones climáticas permitían la

coexistencia de ambos tipos de especies, boreales y meridionales, limitadas a un área geográfica concreta (Blondel y Aronson, 1999). A escala de tiempo grande, es perfectamente aceptable usar el término “migración” *sensu stricto*, en relación a estas especies en el mismo sentido que se usa para referirse a las migraciones estacionales de los animales. Durante los periodos interglaciales, plantas y animales que habían sobrevivido en poblaciones aisladas, se propagaron hacia el centro y norte de Europa nuevamente, sin abandonar las regiones más meridionales. Luego, la supervivencia de las especies de origen boreal, al abrigo de estos refugios durante los periodos glaciales, incrementó el número de especies a bajas latitudes, alternándose entre pequeños núcleos supervivientes, aislados durante periodos climatológicos adversos, y extensas poblaciones durante las cálidas interglaciaciones (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt, 1996, 1999).

La influencia de las penínsulas del Mediterráneo en los patrones de biodiversidad europeos, ha sido destacada por un amplio número de estudios que coinciden, a escala continental, en su contribución, desde refugios glaciales del sur de Europa (Hewitt 2000, 2004; Provan y Bennet, 2008), aunque éstos no han sido únicos y han existido otros refugios tanto para la flora como para la fauna en el continente (p. ej. Stewart y Lister 2001; Weiss *et al.* 2002; Rendell y Ennos 2002, Schmitt y Seitz 2001; Jaarola y Searle 2002; Haynes *et al.* 2003; Deffontaine *et al.* 2005; Nieberding *et al.* 2005; Sommer y Benecke, 2005). Si bien las penínsulas Ibérica, Itálica, Balcánica o Egéa y Anatólica, experimentaron, obviamente, una mayor estabilidad climática que las regiones frecuentadas por los glaciares, también las islas, los valles de los grandes ríos y ciertas laderas montañosas de la cuenca del Mediterráneo, así como áreas cercanas al Cáucaso y el mar Caspio, han sido relevantes durante estos periodos de climatología adversa, especialmente para aquellas especies que encontraron abrigo a bajas latitudes (Taberlet *et al.* 1998; Petit *et al.* 2003; Hewitt, 2004). A lo largo del tiempo, se debieron dar repetidas oportunidades que permitieron la divergencia evolutiva y la especiación a partir de las áreas de distribución iniciales. La fragmentación cíclica en diferentes poblaciones alopátricas en el interior de las principales áreas de refugio, permitió historias demográficas complejas e independientes. Por tanto, mucha de la diversidad genética intra- e interespecífica que observamos en el presente, es el legado de los procesos de diferenciación ocurridos cuando la biota europea estuvo restringida y separada en diversos refugios mediterráneos durante sucesivos periodos en condiciones climatológicas adversas. Estas áreas actuaron a la vez en tres sentidos: a) como refugio permitiendo la supervivencia de las especies de distribución boreal, b) como centros y origen de nuevos endemismos y c) como reservorio y fuente en la recolonización de especies hacia zonas anteriormente heladas ocupadas de nuevo en periodos interglaciales cálidos (Hewitt, 2001; Weiss y Ferrand 2007).

Como anticiparon los primeros estudios (Cooper y Hewitt, 1993; Hewitt, 1996) la compleja topografía y el mosaico geográfico de hábitats en las penínsulas del sur de Europa habrían favorecido, muy probablemente, la existencia de múltiples refugios aislados, permitiendo la persistencia en ellos

de poblaciones durante periodos glaciales. De acuerdo con el concepto de “refugios dentro de refugios” (Gómez y Lunt 2007), las características geográficas de áreas como la Península Ibérica, fragmentada por cadenas montañosas y bordeada por mares, permitió la diversificación de los organismos creando paisajes altamente heterogéneos.

Causas y consecuencias genéticas del proceso evolutivo de diferenciación

Cuando dos poblaciones se desarrollan aisladamente, la interacción génica puede verse interrumpida el tiempo suficiente durante el cual se acumulen mutaciones que, posteriormente, pueden ser fijadas por efecto de la selección natural o a través la deriva genética. Con el aumento de divergencia ocurre una disminución gradual en el flujo génico hasta que se alcanza un umbral de especiación a partir del cual el genoma se encuentra fuertemente ligado a cada linaje y la introgresión se reduce considerablemente entre ellos (Barton y Hewitt, 1989).

Un gran número de evidencias paleontológicas y estudios moleculares sugieren que los mayores cambios climáticos ocurridos, no solo en el Pleistoceno sino desde el Plioceno, produjeron aislamiento biológico favorable para la diferenciación genética en un gran número de especies. Los periodos climáticos cíclicos y los procesos asociados de contracción hacia refugios del sur y expansión posterior hacia el norte, dejaron profundas huellas en la distribución geográfica de la diversidad genética (Taberlet *et al.* 1998; Hampe y Petit 2005). Las expansiones y contracciones en los rangos de distribución espacial de las especies marcan su acervo genético y este hecho ha sido utilizado para la reconstrucción histórica de las poblaciones actuales (Avice, 2000). En general, las poblaciones que han colonizado áreas recientemente, muestran una variabilidad genética más baja que aquellas que sobreviven en refugios, exhibiendo menor tamaño efectivo de población, debido al cuello de botella poblacional de la colonización (efecto fundador). Esto ocurre principalmente debido a eventos de difusión casi continua durante la colonización (Hewitt 1996). Por otro lado, los fenómenos vicariantes en el pasado pueden quedar reflejados por una segregación espacial de los linajes. Tradicionalmente, los patrones de distribución de las especies se interpretan con referencia a eventos biogeográficos históricos y la distribución espacial de los caracteres, a menudo, se interpreta en términos de vicarianza (Avice 2000). Muchas especies muestran una orientación geográfica de los distintos linajes genéticos, es lo que se conoce como unidades filogeográficas. Dependiendo del grupo taxonómico que nos ocupe, así como de la duración del aislamiento y el rango de distribución de la especie, encontramos más o menos posibilidades de diferenciación regional a varios niveles de organización, desde la estructura genética intraespecífica de las poblaciones hasta las subespecies y especies.

El papel de la filogeografía en el estudio de la diversidad biológica

Como hemos explicado, las especies modifican sus rangos de distribución a lo largo del tiempo. La distribución de la variación genética es extremadamente variable y está influenciada por diversos factores temporales. Entre ellos se encuentran los principales eventos geológicos, oscilaciones climáticas y cambios en el hábitat ecológico de muchas especies que han promovido eventos vicariantes y que, como venimos tratando, son utilizados a menudo como argumentos para explicar la diversificación de las especies. Por lo tanto, la distribución actual de la variación genética está determinada, no solo por los requerimientos ecológicos de cada especie, sino también por su historia evolutiva. El conocimiento de la variabilidad genética ha sido fundamental para la reconstrucción de la historia evolutiva de las especies. La estructura de esta variabilidad, considerada en un marco geográfico, es el resultado de las relaciones históricas entre las poblaciones y la propia dinámica poblacional (Avise, 2000). Con la intención de analizar e interpretar los factores históricos que condujeron a la distribución geográfica actual de las diferentes unidades evolutivas (a nivel intra e interespecífico), surgió a finales de la década de los ochenta una nueva disciplina, la filogeografía, que trata de establecer nexos entre la genética poblacional y la sistemática, integrando ciencias como la genética molecular y poblacional, la filogenia, la ecología, la etología, la paleogeografía y la paleontología (Avise *et al.*, 1987). El término filogeografía, descrito la primera por vez Avise *et al.* (1987), se refiere a la disciplina que estudia el papel que tuvieron los factores históricos en la formación de la distribución geográfica de los linajes genealógicos. Atendiendo a esta primera definición, la filogeografía se ocupa de los principios y procesos que rigen la distribución de los linajes y considera conjuntamente tiempo y espacio como ejes de un mapa ideal para una determinada genealogía de genes (Avise, 2000). Así mismo, establece paralelismos con la biogeografía histórica desde el momento en que puede revelar el papel de la vicarianza en la estructura biótica (Riddle *et al.*, 2000). Aunque la filogeografía representa la interconexión de dos campos tradicionalmente distintos, la genética de poblaciones y la filogenia, la universalidad de esta perspectiva es subrayada por la observación de que casi todas las especies en la naturaleza presentan algún nivel de estructuración genética asociada con la geografía (Avise, 2000). El desafío de la filogeografía deriva de la dificultad de descubrir las causas históricas de los procesos geográficos en la conformación de la arquitectura genética actual.

El número de trabajos publicados sobre la filogeografía de multitud de especies de flora y fauna viene aumentando de manera considerable desde finales del siglo pasado (Avise, 2000; Hewitt, 2000) y existen, desde principios del presente siglo, numerosos estudios para diversos grupos taxonómicos en todas las regiones del planeta (Hewitt 2004; Emerson y Hewitt, 2005). Los patrones de similitud entre la distribución geográfica y los linajes evolutivos de especies co-distribuidas o complejos de especies, no suelen ser aleatorios (Gómez y Lunt, 2007). En un intento de identificar los patrones

filogeográficos comunes entre distintos taxones (Taberlet *et al.*, 1998; Arbogast y Kenagy, 2001) apareció la filogeografía comparada, una herramienta fundamental que permite aclarar el papel de la geografía en la distribución de especies, la asociación entre esta y los ciclos climáticos, y puede ayudar a identificar cuáles son las áreas que albergan una elevada diversidad, “*hotspots*” importantes desde el punto de vista de las políticas de conservación. Además, los análisis en filogeografía comparada han proporcionado información pionera en el desarrollo de patrones regionales históricos de distintos linajes genéticos (Bernatchez y Wilson 1998; Avise *et al.*, 1998; Riddle *et al.* 2000; Arbogast y Kenagy 2001). Para explicar estos patrones, han sido propuestos diferentes escenarios de diferenciación en los llamados “refugios glaciales” alopátricos y posteriores expansiones del rango de distribución de las unidades filogeográficas, tanto en aves como en otros grupos de animales y plantas. Un ejemplo clásico de diferenciación entre especies emparentadas lo constituye el caso de los trepadores o sítidos (*Sittidae*). Existen tres especies de trepadores estrictamente endémicos de la cuenca mediterránea, el trepador corso (*S. whiteheadi*) en Córcega, el trepador de Kabilia (*S. ledanti*) que ocupa una pequeña región de Argelia y el trepador de Krüper (*S. krueperi*) en Turquía. Las tres son muy parecidas y sus preferencias ecológicas, morfologías y cantos son similares; sin embargo, se distribuyen de manera fragmentada a lo largo del Mediterráneo. Se esperaría pensar que su diferenciación es reciente, no obstante estudios moleculares sobre el gen mitocondrial *citocromo-b* indican que pertenecen a linajes separados que divergieron durante el Plioceno (Pasquet, 1998). De la misma manera, el trepador azul (*S. europaea*), el trepador siberiano (*S. arctica*), el trepador de las Naga (*S. nagaensis*), el trepador de Cachemira (*S. cashmirensis*), el trepador indio (*S. castanea*), el trepador ventricastaño (*S. cinnamoventris*) y el trepador indochino (*S. neglecta*) también forman un clado cuyas especies componentes se sustituyen geográficamente entre sí de sur a norte y de oeste a este a través de Eurasia.

Europa está caracterizada por un gran número de refugios glaciares pleistocénicos. Las rutas de colonización post-glacial y las zonas de sutura para las especies terrestres han sido bien establecidas y muestran patrones coincidentes (Hewitt, 1996; Taberlet *et al.* 1998; Hewitt, 1999). Los procesos cíclicos de contracción poblacional a refugios del sur y consiguientes expansiones a los territorios del norte han dejado una marcada huella en la distribución geográfica de la diversidad genética dentro de un gran número de especies. Las especies o complejos de especies que se distribuyen ampliamente en Europa, a menudo presentan un gradiente latitudinal en cuanto a la distribución de la diversidad genética. A diferencia de las poblaciones nórdicas, habitualmente menos diversas como consecuencia de la pérdida de estructura causada por la expansión a partir de poblaciones más al sur, la persistencia de las especies confinadas en estos subrefugios alopátricos a largo plazo permitió la diferenciación en una amplia gama de linajes evolutivos independientes. El gradiente de variación genética junto al evidente nivel de diversidad y subestructura que se observa a bajas latitudes en una amplia variedad de taxones –patrón denominado “pureza del norte frente a la riqueza del sur” (Hewitt, 1996; 2000)– constituye una prueba de la existencia de estos múltiples subrefugios glaciales meridionales.

Este modelo lleva implícito varias premisas:

- que los refugios meridionales albergan mayores niveles de biodiversidad en cuanto a riqueza de especies, diversidad genética y endemismos,
- que llevan asociados procesos de radiación evolutiva y sirven como fuente de expansiones demográficas futuras para numerosos organismos,
- que describen rutas de recolonización similares reconocibles en los patrones filogeográficos de especies diferentes,
- que proponen el establecimiento de un escenario de zonas híbridas, donde genomas divergentes entran en contacto secundario y que es especialmente complejo cuando estos ocurren entre linajes con historias evolutivas independientes muy antiguas.

El patrón descrito está bien ilustrado en los primeros estudios filogeográficos europeos realizados en una variedad de taxones (por ejemplo, en los erizos, *Erinaceus europaeus* / *concolor* (Santucci *et al.*, 1998; Seddon *et al.*, 2001), saltamontes, *Chorthippus parallelus* (Cooper *et al.*, 1995), oso, *Ursus arctus* (Taberlet y Bouvet, 1994) y tritón crestado, *Triturus spp.* (Wallis y Arntzen, 1989), entre otros. Por otra parte y debido a los patrones generales de rutas de recolonización descritos en diferentes especies (Hewitt, 1999; Taberlet *et al.*, 1998), aparecen con frecuencia conjuntos de zonas de contacto secundario en el norte de Europa, promoviendo escenarios coincidentes y relativamente complejos en el sur. En la Península Ibérica, estas historias evolutivas están bien investigadas y se describen para una gran variedad de taxones, mostrando patrones notables de concordancia filogeográfica (véase Gómez y Lunt, 2007 y referencias) que implican subdivisiones genéticas profundas, alta riqueza de especies y zonas de contacto secundario entre ellas. De hecho, la complejidad de las historias evolutivas descubiertas, subraya el importante papel que esta región ha jugado en el pasado, no sólo facilitando la redistribución hacia el norte de especies después de repetidos enfriamientos climáticos, sino también fomentando la diversificación mediante patrones concordantes de fragmentación, contracción, expansión y mezcla de las poblaciones. La placa “Ibero-Mauritánica” que derivó en la actual Península Ibérica y la parte norte de Marruecos, fue una matriz fértil que dio origen a la mayor parte de los grupos de animales y plantas que conviven hoy en esa región de Europa y que, gracias a las fluctuaciones Pleistocénicas, modelaron su distribución mediante extinciones y nuevas olas de especiación, que permitieron la diferenciación en los patrones filogeográficos actuales como veremos a continuación.

El papel de la Península Ibérica en los estudios filogeográficos

La Península Ibérica es extremadamente rica en diversidad de especies y endemismos. Aunque ocupa sólo una pequeña parte de Europa Occidental (menos del 6%), el 50% de las especies de vertebrados terrestres y plantas europeas se encuentran en ella. Entre las 8.000 y 9.000 especies de plantas vasculares (helechos y plantas con flores) que existen en la península, más de 6.500 son autóctonas, incluyendo unos 1.500 endemismos únicos en el mundo, y otros 500 compartidos con el Norte de África, lo cual representa el 80% de las especies vegetales existentes en la Unión Europea y casi el 60% de las que se hallan en todo el subcontinente europeo. En cuanto a la fauna, la Península Ibérica posee la mayor riqueza de Europa Occidental, entre 50.000 y 60.000 especies animales, lo que equivale a más del 50% de las existentes en la Unión Europea. El número total de especies endémicas estimado está en torno a un millar, es decir, de las especies endémicas de Europa alrededor del 31% se encuentran en la Península Ibérica (Williams *et al.*, 2000) ocupando una gran variedad de hábitats. De los 226 tipos de hábitats reconocidos como de alto interés por la Unión Europea (Directiva relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres o Directiva Hábitats), 121 (54%) se encuentran en territorio español y 88 (39%) en la región continental de Portugal. Por estas razones, su importancia para la conservación de la biodiversidad ha sido reconocida en las distintas políticas de conservación comunitarias. La Organización No Gubernamental “*Conservation International*” incluye casi el 80% de la zona de la Península Ibérica dentro del *hotspot* de biodiversidad Mediterránea. España es el país mayor de la UE en términos de superficie dentro de la red europea de sitios importantes para la conservación (Red Natura 2000) con un promedio total del 30% del territorio, si el ámbito normativo no se modifica y las Directivas de la Naturaleza se mantienen intactas, como recientemente nueve Estados de la Unión Europea han manifestado, incluido el Estado Español²

La Península Ibérica fue uno de los más importantes refugios pleistocénicos del subcontinente europeo (Hewitt 1999, 2001). Los altos niveles de biodiversidad y endemismos se acompañan también de un alto grado de diversidad genética intraespecífica. Numerosas son las características que han favorecido la supervivencia de gran parte de la flora y fauna europea en la Península Ibérica durante el Pleistoceno. Primero, la Península posee una compleja orografía con montañas orientadas principalmente en dirección este-oeste. Esta orientación ofrece una variedad microclimática que ha podido favorecer la supervivencia de poblaciones a diferentes altitudes, haciendo posible diversos microclimas. Segundo, debido a su posición geográfica la Península Ibérica está bajo la influencia del Atlántico Norte y el Mediterráneo y disfruta de una amplia variedad de climas, que incluye sub-

² En vísperas de la Cumbre del Clima de las Naciones Unidas, que comenzó en París en el mes de noviembre de 2015, donde 195 estados trataron de alcanzar un acuerdo global y vinculante contra el calentamiento del planeta y sus impactos, se celebraba una Conferencia en la Comisión Europea. Más de 300 expertos, incluyendo representantes de instituciones de la Unión, de los ministerios nacionales y ONGs, discutieron las conclusiones del proceso de consulta pública sobre las Directivas de la Naturaleza (“*Fitness Check*”). La revisión de la Estrategia Europea de Biodiversidad destaca su importancia como pilar sobre el que se asienta la red de espacios naturales protegidos (Red Natura 2000). A nivel social una importante campaña en defensa de las directivas comunitarias de protección de la naturaleza, respaldada por un gran número de personas (más de medio millón) y organizaciones ecologistas europeas, se convertía en la mayor respuesta ciudadana a una consulta pública lanzada desde la Comisión Europea en la historia.

desértico, mediterráneo, alpino y atlántico. Estas características, junto con su gran superficie (580.000 km²) nos lleva a considerar que no existiera un solo refugio, sino que constituyeran un escenario de refugios dentro de refugios, “refugia-within-refugia” (Gómez y Lunt, 2007). Esta hipótesis es corroborada por un número cada vez mayor de estudios y, actualmente, es ampliamente aceptado que las razones que sostienen la riqueza biológica de la región están relacionadas con la persistencia de las poblaciones a largo plazo en múltiples subrefugios glaciales. Los datos paleontológicos, palinológicos y paleolimnológicos demuestran la coexistencia de especies templadas durante la Edad de Hielo (Huntley y Borks 1983). La repetición de los mismos patrones filogeográficos en el rango de distribución de multitud de taxones de flora y fauna, pone de manifiesto, en primer lugar, el aislamiento genético al que se vieron sometidas las poblaciones durante el máximo glacial pleistocénico. Los sucesivos periodos de calentamiento y enfriamiento habrían contribuido a la fijación de las diferencias genéticas entre las poblaciones a lo largo del tiempo. Y en segundo lugar, el hecho de que gran número de especies ampliamente distribuidas, hayan entrado desde entonces en un periodo de expansión desde los refugios europeos más meridionales al resto del continente (Hewitt 1996) un proceso que continúa hasta la actualidad. Así, podemos encontrar *grosso modo*, mamíferos, aves, anfibios y plantas que muestran patrones determinados por el hecho de colonizar el oeste y norte de Europa desde la Península Ibérica después de la Edad de Hielo (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 1999; Lenk *et al.* 1999; Beebe y Rowe 2000; Griswold y Baker 2002; Grivet y Petit 2002; Jaarola y Searle 2002; Vernesi *et al.* 2002; Michaux *et al.* 2003).

Ventajas e inconvenientes del uso de marcadores genéticos en los estudios filogeográficos

En los últimos años, el estudio filogeográfico ha adquirido un gran auge gracias al rápido desarrollo de técnicas moleculares que ha permitido extenderlo a un gran número de organismos en todo el planeta (Hewitt 2004). La aplicación de las técnicas moleculares ha revelado que el análisis exclusivo de caracteres morfológicos puede inducir a interpretaciones erróneas de la historia evolutiva de los organismos (Avise y Nelson 1989; Bernatchez y Dondson, 1994; Babik *et al.* 2005). La dificultad de cuantificar la variación a partir de caracteres morfológicos o ecológicos supone un problema importante a nivel específico e intraespecífico, ya que muchos de esos caracteres suelen resultar homoplásicos debido a que los procesos de presión selectiva y adaptación pueden generar convergencia en su expresión y plasticidad. En cambio, bajo algunos supuestos de la Biología Molecular, las técnicas moleculares permiten obviar en gran parte este sesgo (Hillis *et al.*, 1996; Avise, 2001; Edwards, 2009). Por otra parte, la creciente necesidad de delimitar unidades de biodiversidad para su conservación debiera tener un fundamento sólido evolutivamente significativo (ej. Moritz, 1994; Waples *et al.* 2006; Leaché *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011; Camargo *et al.*, 2012),

lo que permite una mejor comprensión de la singularidad evolutiva de las poblaciones (Weisrock *et al* 2001; Ahrens *et al.*, 2013; Carstens *et al.*, 2013; Edwards and Knowles, 2014). Cualquier aproximación debe tratar, en todo caso, el concepto inherente de especie como linajes evolutivos independientes en lugar de delimitar categorías por criterios de especie secundarios (de Queiroz, 1998, 2007) para lo cual, el uso de herramientas moleculares es efectivo y determinante en la mayoría de los casos.

Existe una gran cantidad de caracteres o marcadores moleculares que se han empleado con éxito en el estudio de la variación genética, como son los derivados del estudio de proteínas (e inmunología), de cromosomas (citogenética) y de ácidos nucleicos. Hasta bien entrada la década de los años 60, la caracterización molecular de las poblaciones y especies se realizaba fundamentalmente mediante separación de las variantes de proteínas de acuerdo a su movilidad sobre una matriz sólida cuando eran sometidas a un campo electromagnético (electroforesis de alozimas e isoenzimas) y la hibridación de fragmentos basada en los polimorfismos de fragmentos de restricción (o en su acrónimo en inglés RFLPs), que se basan en definitiva en un patrón de bandas generado cuando el genoma de una especie es digerido por una combinación de enzimas de restricción, la amplificación aleatoria (RAPD) y la combinación entre ambos (AFLPs) en todas sus variantes (SCAR, CAPs, SPAR). Gracias al descubrimiento de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, el desarrollo de las técnicas moleculares ha visto un gran auge a través de numerosos marcadores desde el estudio del polimorfismo de secuencias repetidas en tándem de número variable (STRP en su acrónimo en inglés), los minisatélites (VNTRs) y los microsátélites (SSLPs), los polimorfismos de simples nucleótidos (SNPs) o snurps a la secuenciación de fragmentos de ADN mitocondrial y nuclear. La utilidad de cada una de estas herramientas moleculares depende del grado de resolución y del tipo de cuestión evolutiva que se plantee analizar.

Durante las tres últimas décadas, el análisis de polimorfismo en sistemas proteicos y el análisis de la variación de distintos fragmentos de la molécula mosaico que es el ADN mitocondrial (ADNmt) ha demostrado ser una de las principales fuentes de información para estudio de la variación genética. El ADN mitocondrial no recombinante ha sido la herramienta tradicional de filogeografía molecular (Avice 2000, 2004). Numerosas son las ventajas que contribuyeron a uso que esta molécula ofrece: la facilidad para la extracción y obtención de los datos, la alta tasa de mutación, en comparación con los genes nucleares, la naturaleza haploide y, por tanto, su ausencia de recombinación para la mayoría de las especies (Avice, 2000) y su modo particular de herencia. El ADNmt es heredado por vía materna, al igual que ocurre con el ADN cloroplástico, por lo que virtualmente no recombina, determinando una reducción del tamaño efectivo de población, siendo cuatro veces menor que el tamaño efectivo para genes nucleares. Por lo tanto, se torna un marcador más sensible a la deriva génica (Moore, 1995). También se han descrito varios inconvenientes asociados a la utilización exclusiva del ADNmt

especialmente en el caso de especies sometidas a selección sexual o bajo los efectos de la dispersión, que incluyen la eliminación de polimorfismo ancestral, la introgresión y el flujo génico sesgado por el género (FitzSimmons *et al.*, 1997, ver revisión de Zhang y Hewitt, 2003; Ballard y Whitlock, 2004; Galtier *et al.* 2009).

La utilización de un sólo tipo de marcador, puede conducir a inferencias erróneas debido a la actuación diferencial de la selección natural, a la existencia de fenómenos estocásticos y al distinto grado de resolución que cada problema evolutivo represente (Pamilo y Nei, 1988; Edwards y Beerli, 2000; Ballard y Whitlock, 2004; Knowles y Maddison, 2002). En general, se reconoce y acepta ampliamente que las historias evolutivas obtenidas a partir únicamente del ADNmt se ven limitadas sólo a una genealogía que revela principalmente la historia natural de herencia maternal de un organismo. Las relaciones entre filogrupos inferidos a través ADNmt pueden ser discordantes con las reveladas sobre la base de los genes nucleares (Harrison 1991; Avise 2000) y tales discordancias ilustran varios estudios filogeográficos recientes (por ejemplo: Leache y McGuire, 2006; Riddle *et al.*, 2008; McGuire *et al.*, 2007; Sequeira *et al.*, 2008; Zink y Barrowclough, 2008). Se espera discordancia entre distintos tipos de marcadores cuando el tiempo medio desde la divergencia no es suficiente para permitir la monofilia recíproca, por la evolución lenta de las secuencias de ADN nuclear. Estas discordancias también se explican tanto por la variación ancestral entre las poblaciones, y/o eventos de hibridación más recientes (Avise, 2004). En cualquier caso, en aquellos sistemas donde la dispersión sesgada por el género es fuerte, o se ha producido la hibridación interespecífica en un genoma de orgánulos, el análisis basado únicamente en el marcador de un gen mitocondrial, puede ser totalmente engañoso (Melo Ferreira *et al.* 2005).

El escenario evolutivo en el que se mueven los genes mitocondriales que codifican proteínas en taxones próximos, es básicamente neutralista y se basa en: i) la aparición de nuevos haplotipos, casi exclusivamente por nuevas mutaciones, inserciones y deleciones; ii) la eliminación por selección negativa de las inserciones y deleciones, puesto que el 98% de los cambios de nucleótidos en las primeras posiciones y el 100% en las segundas generan cambios de aminoácidos, mientras que esta cifra sólo es del 32% en las terceras posiciones (mutaciones silenciosas). Por último, iii) influyen también en la fijación o eliminación de los haplotipos por deriva génica, fenómeno que ocurre tanto en a nivel de individuos (por distinto éxito reproductivo) como en el reparto de las mitocondrias entre las células en división durante la ovogénesis. El campo de la investigación filogeográfica, no obstante, sigue estando dominado por estudios que utilizan un solo locus de herencia uniparental (ADNmt, cpDNA) (Weiss y Ferrand, 2007).

El análisis combinado de marcadores resulta una herramienta potente para estudiar las relaciones entre las distintas unidades evolutivas, linajes o especies. La combinación de diferentes marcadores moleculares con diferentes tasas de sustitución, permite investigar la distribución de la

variabilidad genética a diferentes escalas espaciales y temporales. No hay que olvidar que el uso exclusivo de ADNmt corresponde al análisis de un solo locus y la información obtenida se corresponderá con la historia evolutiva de esa molécula y no necesariamente a la de las poblaciones en estudio (Bazin *et al.*, 2006). El estudio de genes nucleares a partir de loci múltiples e independientes se ha mostrado capaz de proporcionar un cuadro más completo de la historia evolutiva de las especies. El enfoque multilocus revela ser una herramienta útil para el estudio de los procesos históricos, demográficos y selectivos que determinan la arquitectura genética de las especies (Hare, 2001). La principal ventaja que representan surge del hecho de que recombinan, permitiéndonos inferir sobre el grado de hibridación y mezcla entre las poblaciones y revelándose extremadamente útiles en el estudio de zonas híbridas (Antunes *et al.*, 2002; Baird *et al.*, 2006; Godinho *et al.*, 2006; Sequeira *et al.*, 2008). Estos marcadores no muestran las desventajas descritas anteriormente para el ADNmt, ya que revelan ambas herencias, masculina y femenina, y son menos susceptibles a los fenómenos estocásticos y de deriva genética, lo que permite la percepción de la historia evolutiva de una especie más profundamente. Sin embargo, esta ventaja unida a la baja tasa de mutación y al elevado tamaño efectivo de población, pueden dificultar en algunos casos las inferencias obtenidas a partir de ellos (Zhang y Hewitt, 2003). Cabe esperar que dada la elevada tasa de cambio del ADNmt en relación al nuclear, los primeros sean eficaces para determinar relaciones entre los grupos terminales de los árboles filogenéticos, en tanto que los marcadores nucleares deberían resultar más útiles en la resolución de los nodos basales (Mindell y Honeycutt, 1990; Hillis y Dixon, 1991; Tan y Wake, 1995).

En la Península Ibérica varios estudios han puesto de relieve la importancia del uso de diferentes tipos de marcadores para describir los complejos escenarios evolutivos y demográficos que probablemente caracterizaron a especies que han persistido durante el Cuaternario. Por ejemplo, en el lagarto verdinegro *Lacerta schreiberi* (Godinho *et al.*, 2008) la evidencia de flujo de genes y la introgresión ancestral entre linajes de ADN mitocondrial, aparentemente alopátricos, sólo fue detectada por el uso de marcadores nucleares. Además, dentro de los límites de las especies de *Podarcis* spp. bien definidos por ADNmt (Pinho *et al.*, 2008), el análisis de genealogías de genes nucleares permitió la detección de la extensa introgresión nuclear entre éstas, que tras un análisis detallado fue identificado como separación incompleta de los linajes y no debido a un reciente flujo génico.

Un problema inherente al análisis filogeográfico, es el error que se comete debido al sesgo de muestreo. La mejor aproximación al patrón filogenético de una especie es aquella que utilizan muestras provenientes del rango máximo posible de distribución de la especie. Los estudios que tratan de mostrar inferencias a gran escala a partir de una pequeña proporción de la distribución, conllevan una serie de dificultades para captar la diversidad genealógica total existente, mostrar patrones filogenéticos fiables y predecir la influencia de la fragmentación del paisaje en la estructura genética

de las poblaciones. Por otro lado, cuando el conjunto de datos proviene únicamente de un solo locus se incrementa la incertidumbre (Weiss y Ferrand, 2007). Otro aspecto a tener en consideración en el análisis filogeográfico, es el enfoque para estimar los tiempos de divergencia entre las poblaciones o taxones hermanos. En la teoría, la separación entre dos linajes, estimada a partir de los datos del ADN, es siempre anterior a la división real de las poblaciones, pues ambos linajes se mantienen juntos durante algún tiempo antes de que ésta se produzca. Muchos estudios ignoran esta diferencia y sobreestiman la divergencia hasta en un 50%, o incluso más, en poblaciones altamente estructuradas (Edwards y Beerli 2000; Arbogast *et al.* 2002). Este sesgo es especialmente relevante cuando los análisis están basados en tasas de cambio universales o calibraciones utilizadas para otros taxones con escalas de tiempo totalmente diferentes. Es el caso de algunos grupos de anfibios ancestrales en comparación con los neo-batracios, como veremos más adelante. La calibración del reloj molecular basada en la evidencia geológica o en el registro fósil puede corregir de manera crucial este sesgo. Una vez más, este problema se incrementa cuando se utiliza la información proveniente de un único locus.

Finalmente, los marcadores de evolución rápida, como los microsatélites, han sido empleados para abordar cuestiones relacionadas con escalas de tiempo contemporáneas. Los microsatélites, con una tasa de mutación promedio estimado de aproximadamente $\mu = 5 \times 10^{-4}$ (Goldstein y Schlotterer, 1999; Whittaker *et al.* 2003), proporcionan una excelente resolución de los procesos microevolutivos recientes y en curso. Mediante el análisis de polimorfismo molecular basado en microsatélites, se puede investigar tanto la existencia de estructura de la población, como el flujo de genes entre las poblaciones y los procesos de hibridación posteriores. La exploración de múltiples loci nucleares a través de zonas de contacto ofrece la oportunidad de comprender de forma más completa el mosaico de patrones moleculares observados entre especies distintas y proporciona nuevos conocimientos sobre la historia evolutiva más reciente.

Con el progreso reciente de las tecnologías de secuenciación de ADN descritas, el campo de la filogeografía ha desplazado rápidamente el enfoque de las cuestiones relacionadas con la cantidad y calidad de los datos (por ejemplo, la identificación de caracteres diagnóstico, la evaluación de congruencia a través de diferentes bases de datos) hacia el desarrollo de herramientas analíticas más eficientes. Esto implica poder extraer el máximo de información a partir de datos moleculares, unido a la posibilidad de integrarlos con la información morfológica, biogeográfica y ecológica. El objetivo es proporcionar resultados repetibles y fiables, de forma que consigan delimitar linajes evolutivos independientes que sean susceptibles de ser considerados especies candidatas y que permitan examinar hipótesis posteriores (Leache *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011; Camargo *et al.*, 2012; Ahrens *et al.*, 2013; Carstens *et al.*, 2013; Edwards y Knowles, 2014). Por ejemplo, la aplicación de metodologías que incorporan la teoría de coalescencia (Drummond y Rambaut, 2007) en base a los datos de ADNmt y genealogías nucleares, permiten estimar parámetros genéticos de población, tales como tamaños de la

población y las tasas de migración (Hey y Nielsen, 2004) y diferentes medidas de diferenciación de la estructura genética poblacional (por ejemplo, F_{st} o equivalentes) basadas en los datos de microsatélites, Si a ello unimos la capacidad de una gran variedad de métodos recientes para inferir grupos usando métodos de agrupamiento bayesianos (como STRUCTURE; Pritchard *et al.*, 2000) e incorporar información sobre su origen geográfico (por ejemplo Geneland, BAPS, TESS), obtenemos un abanico de herramientas muy potentes para contrastar hipótesis y evaluar la diversidad genética a distintos niveles, desde la estructura genética intrapoblacional a la diversidad interpoblacional.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Justificación de la elección del modelo de estudio

El estudio de los fenómenos vicariantes y de los patrones de diversidad genética es especialmente informativo en organismos con escasa capacidad de dispersión y limitado flujo génico. Debido a su limitada tasa de migración y su gran dependencia del medio hídrico, en general, los anfibios muestran una intensa filopatría. Sus patrones de variación genética entre las poblaciones a gran escala tienden a reflejar procesos históricos, en lugar de procesos contemporáneos (ver revisión de Avise, 2000). Los anfibios son, por tanto, sujetos idóneos para examinar estos aspectos y esclarecer los procesos que determinaron sus historias evolutivas (Duellman y Trueb, 1986; Smith y Green, 2005; Zeisset y Beebee, 2008).

Desde una perspectiva biogeográfica, la fauna de anfibios y reptiles de la cuenca mediterránea comenzó a establecerse pronto entre el Eoceno superior y el Mioceno (hace 38-15 Ma.) desde regiones biogeográficas diversas, incluyendo el área Euro-Siberiana, Saharo-Arábica y Turano-Caucásica. La ecofisiología de los anfibios puede explicar en parte la desigual riqueza de especies, especialmente evidente entre el norte y sur de la cuenca mediterránea. Muchas de las especies norteafricanas colonizaron el área, procedentes de Europa antes de la reapertura del estrecho de Gibraltar, al final de la crisis salina del messienense, hace 5.3 millones de años. Ejemplos “recientes” de emigrantes son las salamandras (*Salamandra salamandra*), el sapo común (*Bufo bufo*), el sapo partero (*Alytes obstetricans*) y la ranita meridional (*Hyla meridionalis*). En el norte de África, el número de especies de anfibios declina de oeste a este. Los patrones de distribución diferencial entre reptiles y anfibios sugieren efectos históricos que afectaron de modo ampliamente diverso a los dos grupos. Entre ellos, destacan varios casos de especificidad regional y vicarianza, con relevo de especies este-oeste. Ejemplos de ello son el tritón ibérico, palmeado y común (*Lissotriton* spp.) (Martínez-Solano *et al.*, 2006), el ibérico sapo de espuelas y el resto de miembros de la familia (*Pelobates* spp.) (Crottini, 2007) o las ranitas arbóreas (*Hyla* spp.) (Stöck *et al.* 2012).

A pesar de que la Península Ibérica es uno de los refugios glaciales mejor estudiados en términos filogeográficos, la mayoría de los estudios se centran en especies que, o bien tienen un rango de distribución más o menos estrecho dentro de la región (por ejemplo *Chioglossa lusitanica* (Alexandrino *et al.*, 2000, 2002), *Lacerta scheriberi* (Paulo *et al.*, 2002), *Lissotriton boscai* (Martínez-Solano *et al.*, 2006), o implican complejos de especies que, aunque distribuidas ampliamente, en general, presentan una estructura genética derivada de eventos cladogénicos relativamente antiguos, por ejemplo, *Podarcis spp* (Harris y Sá-Sousa, 2002; Pinho *et al.*, 2008) o *Alytes spp* (Martínez-Solano *et al.*, 2004). Aunque es patente la existencia de distintos subrefugios pleistocénicos en la Península, los análisis a través de zonas de contacto secundario reciente bien definidas son escasos. La hibridación entre linajes en el sur de los límites de distribución evidencia la complejidad e interés que suscita este tipo de estudios (Weiss y Ferrand, 2007).

Familia Pelodytidae

De las 30 especies de anfibios ibéricos, trece son endémicas, lo que supone el 31% del total de especies nativas, no obstante el número de especies y subespecies descritas ha continuado creciendo en los últimos años. Los sapillos moteados o *Pelodytidae* son una familia relativamente rara, debido a su escasez, de arqueobatracios o anfibios primitivos con un número limitado de representantes taxonómicos descritos en un único género existente *Pelodytes* (Bonaparte, 1838), estrechamente emparentado con los Pelobatidos (Savage, 1973), incluyendo actualmente sólo tres especies frente a las más seis mil quinientas especies de anuros vivientes (6554 especies según Frost *et al.*, 2015; Duellman, 1993). Los pelodítidos constituyen un taxón pequeño y ancestral de anuros de reducido tamaño (3-5 cm) de hábitos nocturnos que viven en encharcamientos y aguas de curso lento de la región Eurasiática, exclusivamente en Europa y Asia Occidental, aunque en contraste con las especies europeas la especie asiática muestra preferencia por hábitats acuáticos semi-corrientes (Gasc *et al.*, 1997). La morfología se caracteriza por estadios de caracteres plesiomórficos (Sanchíz *et al.* 2002; Garriga y Llorente, 2011) lo cual, junto a otros caracteres fisiológicos de índole primitiva (Cardellini y Sala, 1987), permiten situar evolutivamente a estos anfibios entre los grupos basales de la radiación del Orden Anura (Duellman y Trueb, 1986; Ford y Cannatella, 1993) y apartados filogenéticamente del grupo de los neobatracios. Las divergencias de los pelodítidos de su grupo hermano (Pelobatidae y Megophryidae, Pyron y Wiens, 2011) tuvieron lugar hace más de 140 millones de años (Roelants *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista taxonómico, Pelodytidae viene siendo agrupado habitualmente a nivel de familia dentro del clado Pelobatoidea, aunque éste no se reconozca siempre de manera consistente, y que comprende, a su vez, tres grupos: Pelobatidae, Pelodytidae y Megophryidae (Frost, 1985). Las relaciones entre estos grupos no están claras y han sido motivo de controversia (Henrici, 1994; Maglia,

1998; García-París *et al.*, 2003). Atendiendo a las hipótesis morfológicas (Ford and Cannatella, 1995; Gao and Wang, 2001) y basadas en la sistemática molecular (Hay *et al.*, 1995; Ruvinsky and Maxon, 1996) las relaciones de estos anuros difieren en cuanto a la posición de Pelobatidae (García-París *et al.*, 2003), lo que unido a la existencia de un limitado registro fósil (Sanchíz, 1998; Rocek and Rage, 2000; Sánchez-Herráiz, 2000) plantea hipótesis biogeográficas no del todo concluyentes. En cualquier caso, Pelodytidae es un grupo monofilético, que forma junto a Pelobatidae, Megophryidae y Scaphiopodidae una agrupación igualmente monofilética (Pelobatoidea) y bien diferenciada del resto de los anuros.

De acuerdo con la clasificación actual, la familia Pelodytidae comprende tres especies morfológicamente similares. *Pelodytes caucasicus*- (Boulenger, 1896), con una distribución aislada y fragmentada que se extienden desde la costa oriental del Mar Negro hasta la ladera norte del Cáucaso (regiones caucásicas y transcaucásicas). Sus poblaciones se encuentran amenazadas y restringidas al noroeste de Azerbaiyán (en la parte Belokany de State Reserve Zakatala), Georgia (sudoeste y Osetia del Sur), Rusia (distrito de Krasnodar) hasta su límite sur en el noreste de Turquía, cerca de la frontera de Georgia (Steiner, 1968; Darevsky *et al* 1971; Bannikov y Drozdov, 1975, Golubev, 1980, Kuzmin, 1997; Iskanderov, 2009). *Pelodytes ibericus* Sánchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom y Sanchíz, 2000, es una especie endémica del sur de la Península Ibérica (Portugal y España), estrechamente relacionada con charcas muy temporales de Alentejo a Andalucía, ocupando casi toda la extensión de esta última región, excepto las provincias orientales (Crespo y Oliveira, 1989; Barbadillo, 2002a; Ceacero *et al.*, 2007). Y, por último, *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1803) que, según los conocimientos actuales, se distribuye de manera discontinua por Europa Occidental, desde la Península Ibérica, en el sureste de España y el suroeste de Portugal, a Francia y el noroeste de Italia (Sindaco y Andreone, 1988; Le Garff, 1988; Guyétant, 1999; Barbadillo, 2002b; Crespo *et al.*, 2008; Denoël *et al* 2009). En la figura 1 se pueden apreciar los rangos de la distribución actuales de las tres especies según el listado de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza o IUCN (acrónimo de sus siglas en inglés: The International Union for Conservation of Nature, Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org 2015).

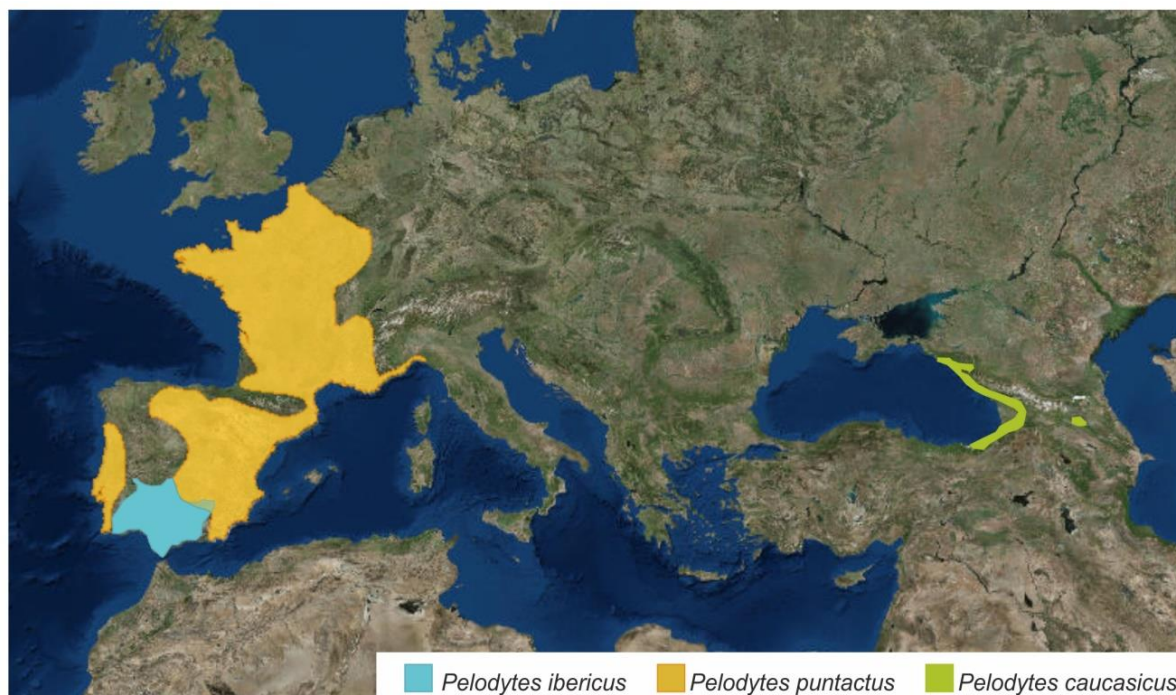


Figura 1: Rangos de la distribución actual de las tres especies del género *Pelodytes* en Eurasia según la IUCN: *P. ibericus* en color azul, *P. punctatus* en color amarillo y *P. caucasicus* en color verde.

La distribución actual de las especies de pelodítidos está limitada a la región Paleártica occidental, en áreas mediterráneas y caucásicas caracterizadas por sus altos niveles de diversidad biológica, ocupando la franja de clima mesotérmico (Escoriza y Ruhi, 2014). No obstante, el restringido límite actual de distribución contrasta con la amplia procedencia de sus taxones fósiles. En base al registro fósil, la familia Pelodytidae estuvo ampliamente distribuida en Europa en el pasado, con presencia documentada, al menos, desde el Eoceno medio, donde parecen haber convivido formas que morfológicamente pueden ser consideradas *Pelodytes* o géneros muy próximos. Se han encontrado en los depósitos Pleistocénicos de Europa y en depósitos de Norteamérica en el Mioceno (Sanchíz, 1998a; Roček y Rage, 2000). Según la información paleontológica disponible, los escasos restos estudiados del Mioceno inferior no son adscribibles a ningún linaje específico actual. En la Península Ibérica, se han identificado *Pelodytes* a lo largo de todo el Neogeno (depósitos de Soria y Teruel). En el Mioceno medio se ha descrito una especie ibérica, *P. arevacus*, similar a las vivientes actualmente en la península, y considerado posible antecesor de ellas (Sanchíz, 1978; Sanchíz *et al.* 2002). El registro paleontológico del mioceno y plioceno no aporta datos cronológicos fiables sobre la hipotética diferenciación de *Pelodytes* en los actuales linajes oriental (*P. caucasicus*) y occidental (*P. punctatus* y *P. ibericus*).

Hasta finales del siglo XX, todas las poblaciones del género del sapillo moteado común en Europa occidental fueron asignados a una sola especie, *P. punctatus* (Arnold *et al.*, 1978). Después del descubrimiento de ciertas diferencias bioacústicas entre poblaciones francesas e ibéricas del sur

(Paillette *et al.*, 1992), estudios detallados de la morfología, osteología y aloenzimas, llevaron a la descripción de las poblaciones españolas más meridionales como una nueva especie, el sapillo moteado ibérico, *P. ibericus* (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000). La diferenciación de esta especie se confirmó posteriormente por una serie de estudios adicionales (Pargana *et al.* 2003; García-París *et al.* 2003; Veith *et al.* 2006; Crespo *et al.* 2010) aunque hasta muy recientemente se carecía de análisis que pusieran de manifiesto la existencia de zonas de contacto entre ambas especies (Van Vliet *et al.* 2012). Estudios genéticos a escala detallada han revelado que el patrón de diferenciación genética es más complejo de lo que originalmente se pensaba, con dos linajes adicionales, lo que sugiere una historia evolutiva de diferenciación alopátrica con contacto secundario reciente entre ellos (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2015).

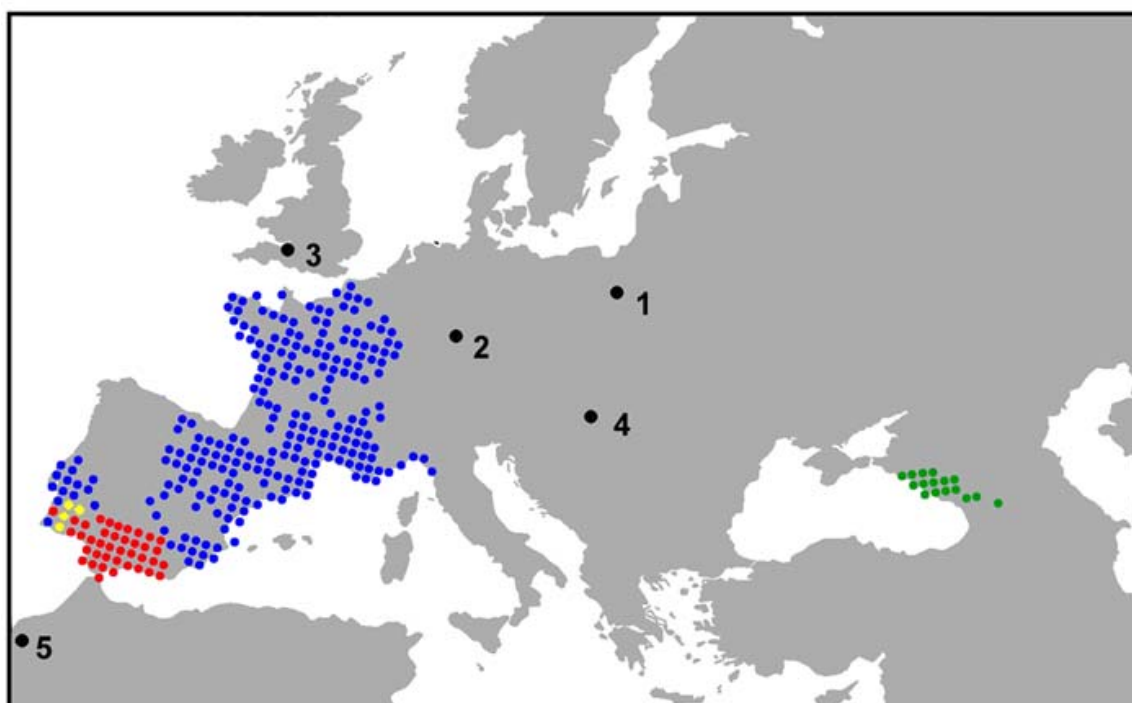


Figura 2. Yacimientos del Cuaternario conocidos de pelodítidos en Europa. La distribución (UTM 50x50 km) modificada sigue a Gasc *et al.* (1997). 1: Kozi Grzbiet (Polonia). 2: Steinbruch Schmid (Alemania). 3: Westbury (Reino Unido). 4: Baradla (Hungría). 5: Jebel Irhoud (Marruecos), con presencia dudosa de *Pelodytes*. Azul: *Pelodytes punctatus*. Rojo: *Pelodytes ibericus*. Amarillo: especie indeterminada de *Pelodytes*. Verde: *Pelodytes caucasicus*.

A continuación, pasaremos a enumerar los objetivos de esta tesis, tanto de modo genérico, como pormenorizado a través de una serie de objetivos específicos.

OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Objetivos de la Tesis Doctoral

El objetivo general de la presente tesis es reconstruir la historia evolutiva del género *Pelodytes* y los procesos macro y micro evolutivos que han determinado (y determinan) los patrones de diversidad genética de las poblaciones distribuidas en el interior de la Península Ibérica.

El objetivo último, es poner de manifiesto mediante el desarrollo de una hipótesis robusta, la relevancia de los procesos, históricos y contemporáneos, en la arquitectura genética de estas especies, determinando el grado de diferenciación actual y discutiendo las posibles implicaciones taxonómicas de los resultados. Para ello, se tratarán de esclarecer los procesos evolutivos que determinan los patrones de variación genética de las poblaciones y la relación entre los procesos genealógicos y demográficos. De una parte, se explorarán los fenómenos que originaron la diversidad genética actual mediante el uso de una metodología integrada, combinando un enfoque molecular multilocus (polimorfismo de genealogías de ADN mitocondrial, ADN nuclear y de marcadores de evolución rápida, microsatélites) al análisis de los caracteres fenotípicos de las especies, partiendo de un diseño de muestreo a distintas escalas en base al tipo de preguntas que se plantean en cada caso.

Para lograrlo planteamos los siguientes objetivos específicos:

- i) definir la diversidad actual mediante el empleo de diferentes marcadores moleculares (nucleares y mitocondriales),
- ii) identificar los principales linajes evolutivos en Iberia y estimar los tiempos de divergencia entre ellos;
- iii) analizar el grado de diferenciación genotípica y fenotípica encontrada;
- iv) delinear la distribución de las unidades filogeográficas existentes y determinar las posibles áreas de contacto secundario;
- v) detectar los niveles de introgresión e hibridación entre las diferentes formas;
- vi) inferir los procesos responsables que han dado origen a los patrones de estructura y distribución actual de las especies;
- vii) y en última instancia, discutir las implicaciones evolutivas y taxonómicas que permitan contribuir a la conservación de la diversidad genética de sus poblaciones.

Organización general de la Tesis Doctoral

La estructura de la tesis seguirá los objetivos específicos a lo largo de los diferentes capítulos (artículos publicados o en proceso de publicación) como se detalla a continuación:

Capítulo primero: Evidencia molecular de especies candidatas crípticas en los *Pelodytes* ibéricos.

Molecular evidence for cryptic candidate species in Iberian Pelodytes (Anura, Pelodytidae). Díaz-Rodríguez, J., Gonçalves, H., Sequeira, F., Sousa-Neves, T., Tejedo, M., Ferrand, N. y Martínez-Solano, I. (2015). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 224–241.

1. En primer lugar, se investiga la variación genética y las relaciones entre las distintas poblaciones del género que cohabitan la Península Ibérica. Para ello, se identifican los principales linajes evolutivos, partiendo de un extenso número de muestras pertenecientes a todo el rango de distribución en Europa Occidental, a través de un enfoque multilocus basado en un modelo coalescente, que permita evaluar la congruencia entre diferentes *loci* nucleares y mitocondriales, y delimitar estos linajes *a posteriori* con métodos de validación de especies.
2. Se tratan de definir, partiendo de un exhaustivo muestreo, los patrones filogeográficos, los límites de distribución actuales e identificar las zonas de contacto secundario entre las diferentes formas en base a los resultados del análisis de las genealogías moleculares.
3. Como tercer objetivo, exploramos mediante diferentes medidas de diversidad genética, la influencia de los factores demográficos que han determinado los patrones de distribución y la estructura poblacional actual.

Capítulo segundo: Taxonomía de cara de la especiación críptica: integración de datos moleculares, bioacústicos y morfológicos sugieren dos nuevas especies de *Pelodytes* de la Península Ibérica

Taxonomy in face of cryptic speciation: integration of molecular, bioacoustic and morphological data suggest two new species of *Pelodytes* from the Iberian Peninsula. Díaz-Rodríguez, J., Gehara, M., Márquez, R., Vences, M., Tejedo, M. (2015). Accepted in *Zootaxa*.

4. En este segundo capítulo, se describe, de manera integrada, la estructura genética al interior del complejo de especies que ha dado lugar a una variedad de caracteres. Mediante el uso de

múltiples marcadores nucleares de evolución más lenta (y ampliando los análisis precedentes), se investiga de forma más completa el mosaico de patrones genealógicos observados.

5. También se analizan de forma comparada la diferenciación genética, morfológica y bioacústica en cada uno de los clados detectados integrando los resultados en la delimitación de especies
6. Por último, se evalúan sus implicaciones taxonómicas dentro del género aportando un nuevo punto de vista a los conocimientos sobre la historia evolutiva del género en la Península.

Capítulo tercero: Análisis genético de dos zonas de contacto secundario entre *P. atlanticus*, *P. ibericus* y *P. hespericus* en el sur de la Península Ibérica

Genetic analysis of two secondary contact zones between *P. atlanticus*, *P. ibericus* and *P. hespericus* in Southern Iberian Peninsula.

7. El objetivo del tercer capítulo es analizar los procesos de flujo genético, introgresión e hibridación y determinar la contribución de los individuos híbridos al proceso de especiación. Para ello se exploran, de manera independiente, los patrones de mezcla en el interior de dos zonas híbridas a través de la variación mitocondrial y el polimorfismo de marcadores nucleares de evolución rápida (microsatélites).
8. Por otro lado, se tratan de determinar específicamente los factores que influyen en la estructura genética de estas dos zonas, sean principalmente intrínsecos o extrínsecos, debidos a barreras de aislamiento reproductivo pre y post-cigóticas o asociados a la adaptación diferencial al hábitat.

Discusión general

9. Finalmente profundizamos, a partir de los patrones filogeográficos de los resultados obtenidos, en las dinámicas de fragmentación, diferenciación y expansión postglacial que han dado origen a dicha estructura aportando una visión integradora al conocimiento actual sobre el tiempo de separación y la localización geográfica de la diversificación genética en el género *Pelodytes* en la Península Ibérica.
10. Se tratan de identificar las áreas de refugio y compararlas a los patrones publicados para otras especies y plantar las bases para un estudio que permita en el futuro delinear medidas de conservación prioritarias y esfuerzos eficaces para la conservación de las especies.

Referencias

- Ahrens, D., Fabrizi, S., Šipek, P., Lago, P.K., (2013). Integrative analysis of DNA phylogeography and morphology of the European rose chafer (*Cetonia aurata*) to infer species taxonomy and patterns of postglacial colonisation in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69, 83–94.
- Alex Smith, M., y M Green, D. (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. *Ecography*, 28(1), 110-128.
- Alexandrino, J., Arntzen, J. W., y Ferrand, N. (2002). Nested clade analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Heredity*, 88(1), 66-74.
- Alexandrino, J., Froufe, E., Arntzen, J. W., y Ferrand, N. (2000). Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology*, 9(6), 771-781.
- Antunes, A., Faria, R., Johnson, W. E., Guyomard, R., y Alexandrino, P. (2006). Life on the edge: the long-term persistence and contrasting spatial genetic structure of distinct brown trout life histories at their ecological limits. *Journal of Heredity*, 97(3), 193-205.
- Arbogast, B. S., Edwards, S. V., Wakeley, J., Beerli, P., y Slowinski, J. B. (2002). Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annual review of Ecology and Systematics*, 707-740.
- Arbogast, B. S., y Kenagy, G. J. (2001). Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28(7), 819-825.
- Arnold, N., Burton, J.A. y Ovenden, D.W. (1978) A Field Guide to Reptiles and Amphibians of Britain and Europe. *Harper Collins*, London.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Avice, J. C. (2001). Evolving genomic metaphors: a new look at the language of DNA. *Science*, 294(5540), 86-87.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., y Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 489-522.
- Avice, J. C., Walker, D., y Johns, G. C. (1998). Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1407), 1707-1712.
- Avice, J. C., y Nelson, W. S. (1989). Molecular genetic relationships of the extinct dusky seaside sparrow. *Science*, 243(4891), 646-648.
- Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja-Isailovic, J., Cogălniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., y Arntzen, J. W. (2005). Phylogeography of two European newt species—discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology*, 14(8), 2475-2491.
- Baird, A. B., Krejca, J. K., Reddell, J. R., Peden, C. E., Mahoney, M. J., y Hillis, D. M. (2006). Phylogeographic structure and color pattern variation among populations of *Plethodon albagula* on the Edwards Plateau of central Texas. *Copeia*, 2006(4), 760-768.
- Ballard, J. W. O., y Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4), 729-744.
- Bannikov, A. G., y Drozdov, N. N. (1975). On the reproductive biology of *Pelodytes caucasicus*. *Ekologiya (Sverdlovsk)*(2), 82-84.
- Barbadillo, L. J. (2002b) *Pelodytes punctatus*. Pp. 100–102. In: Pleguezuelos, J. M., Márquez, R., Lizana, M. (Eds.). *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Barbadillo, L.J., (2002a). *Pelodytes ibericus*. In: Atlas de distribución y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España. eds. J. M. Pleguezuelos, R. Márquez, and M. Lizana, p. 97-99. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- Barton, N. H., y Hewitt, G. M. (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341(6242), 497-503.
- Bazin, E., Glémin, S., y Galtier, N. (2006). Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, 312(5773), 570-572.
- Beebee, T. J., y Rowe, G. (2000). Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(3), 367-381.
- Bernatchez, L., y Dodson, J. J. (1994). Phylogenetic relationships among Palearctic and Nearctic whitefish (*Coregonus* sp.) populations as revealed by mitochondrial DNA variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(S1), 240-251.
- Bernatchez, L., y Osinov, A. (1995). Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology*, 4(3), 285-298.
- Bernatchez, L., y Wilson, C. C. (1998). Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology*, 7(4), 431-452.
- Bickford, D., Lohman, D., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 148–155.
- Blondel, J., y Aronson, J. (1999). *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. Oxford University Press.
- Bonaparte, C. L. J. L. (1838). Synopsis vertebratorum systematis.
- Camargo, A., Morando, M., Avila, L.J., Sites, J.W., Jr, (2012). Species delimitation with ABC and other coalescent-based methods: a test of accuracy with simulations and an empirical example with lizards of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae). *Evolution* 66, 2834–2849.
- Cardellini, P. y Sala, M. (1987) Hemoglobin transition in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 86(1), 85–89.
- Carretero, M. A., Sá-Sousa, P., Barbosa, D., Harris, D. J., y Pinho, C. (2002). Sintopía estricta entre *Podarcis bocagei* y *P. carbonelli*. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 13 (1-2), 20-24.

- Carstens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M. y Satler, J.D. (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22, 4369–4383.
- Ceacero, F., García-Muñoz, E., Pedrajas, L., Hidalgo, A. y Guerrero, F. (2007) Actualización herpetológica de la provincia de Jaén. Pp. 130-139. In: Gosá, A., Egaña-Callejo, A., Rubio, X. (Eds.). *Herpetologia iberiarraren egoera = Estado actual da Herpetologia Ibérica = Estado actual de la Herpetología Ibérica : Lehen Herpetologia Kongressua Euskal Herrian, IX Congresso Luso-Espanhol, XIII Congreso Español de Herpetología*. Munibe. Suplemento, 25, 303 pp.
- Cooper, S. J. B., Ibrahim, K. M., y Hewitt, G. M. (1995). Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology*, 4(1), 49-60.
- Cooper, S. J. B., y Hewitt, G. M. (1993). Nuclear DNA sequence divergence between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Insect Molecular Biology*, 2(3), 185-194.
- Coyne, J. A., y Orr, H. A. (2004). *Speciation* (Vol. 37). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Crespo EG, Marquez R, Pargana J, Tejedó M (2010) *Pelodytes spp.* In: Loureiro A *et al* (eds) Atlas dos anfíbios e répteis de Portugal. *Esfera do Caos*, Lisboa, pp 112–115
- Crespo, E. G. y Oliveira, M.E. (1989) Atlas da Distribucao dos Anfíbios e Répteis de Portugal Continental. Servicio Nacional de Parques Reservas e Conservacao da Naturaleza, Lisboa, 98 pp.
- Crottini, A., Andreone, F., Kosuch, J., Borkin, L. J., Litvinchuk, S. N., Eggert, C., y Veith, M. (2007). Fossorial but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability. *Molecular Ecology*, 16(13), 2734-2754.
- Darevsky, I. S., Drozdov, N. N. y Orlova, V. F. (1971) The new data about geographic distribution of the Caucasian parsley frog—*Pelodytes caucasicus* Boulenger (Amphibia, Salientia). *Vestn. Zool.*, (3), 77–78.
- Darwin, C. (1859). On the origins of species by means of natural selection. *London: Murray*, 247.
- Davis, M. B. (1976). Pleistocene biogeography of temperate deciduous forests. *Geoscience and man*, 13, 13-26.
- de Queiroz, K. (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. pp 57–75 in *Endless Forms: Species and Speciation* (D. J. Howard, and S. H. Berlocher, eds.). *Oxford University Press*, New York.
- de Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879-886.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E. y Michaux, J. R. (2005). Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, 14(6), 1727-1739.
- Denoël, M., Beja, P., Andreone, F., Bosch, J., Miaud, C., Tejedó, M., Lizana, M., Martínez-Solano, I., Salvador, A., García-París, M., Recuero Gil, E., Marquez, R., Cheylan, M., Díaz Paniagua, C. y Pérez-Mellado, V., (2009) *Pelodytes punctatus*. In: *IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-3*. <www.iucnredlist.org>. (accessed on November 2015).
- Díaz-Rodríguez, J., Gonçalves, H., Sequeira, F., Sousa-Neves, T., Tejedó, M., Ferrand, N. y Martínez-Solano, I. (2015) Molecular evidence for cryptic candidate species in Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 224–241.
- Drummond, A. J., y Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 214.
- Duellman, W. E. y Trueb, L. (1986) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York. 670 pp.
- Duguet, R. y Melki, F. (Eds.). (2003) *Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Biotope Éditions, Mèze*.
- Duellman, W. E., y Wild, E. R. (1993). *Anuran amphibians from the Cordillera de Huancabamba, northern Peru: systematics, ecology, and biogeography*. University of Kansas.
- Edwards, D.L., Knowles, L.L., (2014). Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 20132765.
- Edwards, S., y Beerli, P. (2000). Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54(6), 1839-1854.
- Edwards, S.V., (2009). Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution* 63, 1–19.
- Emerson, B. C., y Hewitt, G. M. (2005). Phylogeography. *Current biology*, 15(10), R367-R371.
- Escoriza, D. y Ruhí, A. (2014) Macroecological patterns of amphibian assemblages in the Western Palearctic: Implications for conservation. *Biological Conservation*, 176, 252–261.
- Fitz Simmons, N., Moritz, C., Limpus, C. J., Pope, L., y Prince, R. (1997). Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics*, 147(4), 1843-1854.
- Ford, L.S. y Cannatella, D.C. (1993) The major clades of frogs. *Herpetological Monographs*, 7, 94–117.
- Ford, L.S., Cannatella, D.C., (1993). The major clades of frogs. *Herp. Monogr.* 7, 94–117.
- Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F. y Raxworthy, C. J. (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of natural History*, 1-291.
- Frost, D.R., (1985). *Amphibian Species of the World. Publ. Assoc. Systematics Collections*, Lawrence.
- Frost, Darrel R. 2015. *Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0* (accessed on November, 2015). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.htm> I. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Futuyma, D. J. (1998). *Evolutionary biology*. Sinauer.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., y Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22), 4541-4550.
- Gao, K.-Q., Wang, Y., (2001). Mesozoic anurans from Liaoning Province, China, and phylogegetic

relationships of Archaeobatrachian Anuran clades. *J. Vert. Paleontol.* 21, 460–476.

García-París M. y Martínez-Solano, I. (2001) Nuevo estatus taxonómico para las poblaciones iberomediterráneas de *Alytes obstetricans* (Anura: Discoglossidae). *Revista Española de Herpetología*, 15, 99–113.

García-París, M., Buchholz, D.R. y Parra-Olea, G. (2003) Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28, 12–23.

Garriga, N., Llorente G. A. (2011). Chondrocranial ontogeny of *Pelodytes punctatus* (Anura: Pelodytidae). Response to competition: geometric morphometric and allometric change analysis. *Acta Zoologica*, 93: 453–464. Gasc et al. 1997

Godinho R, Crespo EG, Ferrand N (2008) The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in a highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Molecular Ecology* 17, 4670–4683.

Godinho R, Mendonca B, Crespo EG, Ferrand N (2006) Genealogy of the nuclear beta-fibrinogen locus in a highly structured lizard species: comparison with mtDNA and evidence for intragenic recombination in the hybrid zone. *Heredity* 96, 454–463.

Goldstein DB, Schlötterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford.

Golubev, N. S. (1980). On the area of distribution of *Pelodytes caucasicus* (Amphibia, Pelobatidae). *Vestnik Zoologii*, 1980, 52–55.

Gómez, A., Lunt, D., (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. *Phylogeography in Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity* 155–188.

Griswold, C. K., y Baker, A. J. (2002). Time to the most recent common ancestor and divergence times of populations of common chaffinches (*Fringilla coelebs*) in Europe and North Africa: insights into Pleistocene refugia and current levels of migration. *Evolution*, 56(1), 143–153.

Grivet, D., y Petit, R. J. (2002). Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology*, 11(8), 1351–1362.

Guyétant, R., Temmermans, W., Avriillier, J. N. (1999). Phénologie de la reproduction chez *Pelodytes punctatus* Daudin, 1802 (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia*, 20: 149–160.

Hampe, A., y Petit, R. J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology letters*, 8(5), 461–467.

Hare, M. P. (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology y Evolution*, 16(12), 700–706.

Hay, J.M., Ruvinsky, I., Hedges, S.B., Maxson, L.R., (1995). Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. *Mol. Biol. Evol.* 12, 928–937.

Haynes, S., Jaarola, M., y Searle, J. B. (2003). Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago. *Molecular Ecology*, 12(4), 951–956.

Hays, J. D., Imbrie, J., y Shackleton, N. J. (1976). Variations in the Earth's orbit: pacemaker of the ice ages. *American Association for the Advancement of Science*.

Henrici, A.C., (1994). *Tephrodytes brassicarvalis*, new genus and species (Anura: Pelodytidae), from the Arikarean Cabbage Patch Beds of Montana, USA, and Pelodytid–Pelobatid relationships. *Ann. Carnegie Mus.* 63, 155–183.

Henrici, A.C., (2000). Reassessment of the North American pelobatid anuran *Eopelobates guthriei*. *Ann. Carnegie Mus.* 69, 145–156.

Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907–913.

Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society*, 58 (3), 247–276.

Hewitt, G. M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1–2), 87–112.

Hewitt, G. M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular ecology*, 10(3), 537–549.

Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359 (1442), 183–195.

Hey, J., y Nielsen, R. (2004). Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*, 167(2), 747–760.

Hillis, D. M., y Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 411–453.

Huntley, B., y Birks, H. J. B. (1983). *An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0–13000 years ago*. Cambridge University Press.

Iskanderov, T. (2009). Current Status of the Caucasus Toad (*Bufo verucosissimus* Pall., 1814) and Caucasus Parsley Frog (*Pelodytes caucasicus* Boul., 1896) in Azerbaijan. *Status and Protection of Globally Threatened Species in the Caucasus*, 151.

IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015–4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 1 December 2015

Jaarola, M., y Searle, J. B. (2002). Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, 11(12), 2613–2621.

Jarman, S. N., y Elliott, N. G. (2000). DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology*, 13(4), 624–633.

Jiggins, C. D., y Mallet, J. (2000). Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology y Evolution*, 15(6), 250–255.

Knowles, L. L., y Maddison, W. P. (2002). Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, 11(12), 2623–2635.

Kuzmin, S. L. (1997). *Pelodytes caucasicus* (Boulenger, 1896). J.– P. Gasc, A. Cabela, J. Crnobrnja–Isailovic, D. Dolmen, K. Groosenbacher, P. Haffner, J. Lescure, H. Martens, JP Martínez Rica, H. Maurin, ME Oliveira, TS Sofianidou, M. Veith, and A. Zuiderwijk

- (eds.), *Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe*, 114-115.
- Le Garff, B. (1988). Amphibiens et reptiles de Bretagne. *Penn Ar Bed*, 17, 3-4.
- Leaché, A. D., y McGuire, J. A. (2006). Phylogenetic relationships of horned lizards (Phrynosoma) based on nuclear and mitochondrial data: Evidence for a misleading mitochondrial gene tree. *Molecular phylogenetics and evolution*, 39(3), 628-644.
- Leaché, A.D., Koo, M.S., Spencer, C.L., Papenfuss, T.J., Fisher, R.N., McGuire, J.A., (2009). Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 12418-12423.
- Lenk, P., Fritz, U., Joger, U., y Wink, M. (1999). Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). *Molecular ecology*, 8(11), 1911-1922.
- Maglia, A.M., (1998). Phylogenetic relationships of extant pelobatoid frogs (Anura: Pelobatoidea): evidence from adult morphology. *Sci. Papers Nat.Hist.Mus.Univ.Kansas* 10, 1-19.
- Martín Piera, F., 1991. Sistemática, biodiversidad y conservación del medio natural. *Jornadas sobre el Medio Natural Albacetense*, 1: 409-413.
- Martínez-Solano, I., Gonçalves, H. A., Arntzen, J. W., y García-París, M. (2004). Phylogenetic relationships and biogeography of midwife toads (Discoglossidae: Alytes). *Journal of Biogeography*, 31(4), 603-618.
- Martínez-Solano, I., Teixeira, J., Buckley, D., García-París, M., (2006). Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology* 15, 3375-3388.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*. Harvard University Press.
- McGuire, J. A., Linkem, C. W., Koo, M. S., Hutchison, D. W., Lappin, A. K., Orange, D. I., ... y Jaeger, J. R. (2007). Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of crotaphytid lizards. *Evolution*, 61(12), 2879-2897.
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Suchentrunk, F., Ferrand, N., y Alves, P. C. (2005). Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology*, 14(8), 2459-2464.
- Michaux, J. R., Magnanou, E., Paradis, E., Nieberding, C., y Libois, R. (2003). Mitochondrial phylogeography of the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Molecular Ecology*, 12(3), 685-697.
- Milankovitch M (1941) Kanon der Erdbestrahlung und seine Anwendung auf das Eiszeitproblem. *Akad Royal Serbe*, 133, 1-633. Translated into English as *Canon of Insolation and the Ice Age Problem*. Alven Global, 1998.
- Mindell, D. P., y Honeycutt, R. L. (1990). Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 541-566.
- Moore, W. S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 718-726.
- Morescalchi, A., Olmo, E. y Stingo, V. (1977) Trends of karyological evolution in pelobatoid frogs. *Experientia*, 33, 1577-1578.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., y Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nieberding, C., Libois, R., Douady, C. J., Morand, S., y Michaux, J. R. (2005). Phylogeography of a nematode (*Heligmosomoides polygyrus*) in the western Palearctic region: persistence of northern cryptic populations during ice ages?. *Molecular Ecology*, 14(3), 765-779.
- Olmstead, R. G. (1996). *Molecular systematics* (Vol. 23). D. M. Hillis, C. Moritz, y B. K. Mable (Eds.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Paillette, M., Oliveira, M.E., Rosa, H.D. y Crespo, E.G. (1992) Is there a dialect in *Pelodytes punctatus* from southern Portugal? *Amphibia-Reptilia*, 13, 97-108.
- Pamilo, P., y Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Molecular biology and evolution*, 5(5), 568-583.
- Pargana, J.M., Marquez, R., Reques, R., Sánchez Herráiz, M.J., Tejedo, M., Crespo, E.G., (2003). The mating call of *Pelodytes ibericus* (Anura, Pelodytidae). *Herpetological Journal* 13, 199-204.
- Paulo, O. S., Jordan, W. C., Bruford, M. W., y Nichols, R. A. (2002). Using nested clade analysis to assess the history of colonization and the persistence of populations of an Iberian lizard. *Molecular Ecology*, 11(4), 809-819.
- Paulo, O. S., Pinheiro, J., Miraldo, A., Bruford, M. W., Jordan, W. C., y Nichols, R. A. (2008). The role of vicariance vs. dispersal in shaping genetic patterns in ocellated lizard species in the western Mediterranean. *Molecular Ecology*, 17(6), 1535-1551.
- Petit, R. J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J. L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., ... y Mohanty, A. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *science*, 300(5625), 1563-1565.
- Pfenniger, M., y Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 121.
- Pinho, C., Harris, D. J., y Ferrand, N. (2008). Non-equilibrium estimates of gene flow inferred from nuclear genealogies suggest that Iberian and North African wall lizards (*Podarcis* spp.) are an assemblage of incipient species. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 63.
- Popper, K., "Logik der Forschung" (1934), tr. V. Sánchez de Zavala, "La Lógica de la Investigación Científica", Tecnos, Madrid, 1967
- Provan, J., y Bennett, K. D. (2008). Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in ecology y evolution*, 23(10), 564-571.
- Pyron, R. A., y Wiens, J. J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 543-583.
- Rendell, S., y Ennos, R. A. (2002). Chloroplast DNA diversity in *Calluna vulgaris* (heather) populations in Europe. *Molecular Ecology*, 11(1), 69-78.
- Riddle, B. R., Dawson, M. N., Hadly, E. A., Hafner, D. J., Hickerson, M. J., Mantooth, S. J., y Yoder, A. D. (2008). The role of molecular genetics in sculpting

the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography*, 32(2), 173-202.

Riddle, B. R., Hafner, D. J., Alexander, L. F., y Jaeger, J. R. (2000). Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14438-14443.

Rivera, P.C., Di Cola, V., Martínez, J.J., Gardenal, C.N., Chiaraviglio, M., (2011). Species delimitation in the continental forms of the genus *Epicrates* (Serpentes, Boidae) integrating phylogenetics and environmental niche models. *PLoS ONE* 6, e22199.

Rocek, Z., y Rage, J. C. (2000). Tertiary Anura of Africa, Asia, Europe, North America, and Australia. *Amphibian biology–paleontology Volume Chapter, 15*.

Roelants, K., Gower, D.J., Wilkinson, M., Loader, S.P., Biju, S.D., Guillaume, K., Moriau, L. y Bossuyt, F. (2007) Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 104, 887–892.

Rundle, H. D., y Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology letters*, 8(3), 336-352.

Ruvinsky, I., y Maxson, L. R. (1996). Phylogenetic relationships among bufonoid frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(3), 533-547.

Sánchez-Herráiz, M., Barbadillo, L., Machordom, A. y Sanchíz, B. (2000) A new species of pelodytid frog from the Iberian Peninsula. *Herpetologica*, 56, 105–118.

Sánchez-Herráiz, M.J. (2004) Análisis de la diferenciación genética, morfológica y ecológica asociadas a la especiación en el género *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Sanchiz, B., (1978). Nuevos restos fósiles de la familia Pelodytidae (Amphibia, Anura). *Estudios Geológicos*, 34: 9-27.

Sanchiz, B., (1998a). *Salientia. Handbuch der Paläoherpetologie Pars 4*. Dr. F. Pfeil, Munich.

Sanchíz, B., Tejedó, M. y Sánchez-Herráiz, M. (2002) Osteological differentiation among Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Graellsia*, 58, 35–68.

Savage, J.M. (1973): The geographic distribution of frogs: patterns and predictions. In: *Evolutionary Biology of the Anurans*, p. 351-445. J.L. Vial, Ed., Columbia: Univ. Missouri Press.

Schluter, D. (2009). Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, 323(5915), 737-741.

Schmitt, T., y Seitz, A. (2001). Allozyme variation in *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): identification of ice-age refugia and reconstruction of post-glacial expansion. *Journal of Biogeography*, 28(9), 1129-1136.

Sequeira, F., Alexandrino, J., Weiss, S., y Ferrand, N. (2008). Documenting the advantages and limitations of different classes of molecular markers in a well-established phylogeographic context: lessons from the Iberian endemic Golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Caudata: Salamandridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 95(2), 371-387.

Sindaco, R. y Andreone, F. (1988) Considerazioni sulla distribuzione di *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1802) in territorio italiano. *Atti del Museo Civico di Scienze Naturali di Trieste*, 41, 161–167.

Sommer, R., y Benecke, N. (2005). Late-Pleistocene and early Holocene history of the canid fauna of Europe (Canidae). *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 70(4), 227-241.

Steiner, H. M. (1968). *Pelodytes caucasicus* Boulenger 1896 (Pelobatidae, Amphibia) in der Türkei. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 291-298.

Stewart, J. R., y Lister, A. M. (2001). Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology y Evolution*, 16(11), 608-613.

Stöck, M., Dufresnes, C., Litvinchuk, S. N., Lymberakis, P., Biollay, S., Berroneau, M. y Perrin, N. (2012). Cryptic diversity among Western Palearctic tree frogs: Postglacial range expansion, range limits, and secondary contacts of three European tree frog lineages (*Hyla arborea* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 1-9

Sturmbauer, C., y Meyer, A. (1992). Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes

Taberlet, P., Fumagalli, L. U. C. A., Wust-Saucy, A. G., y Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology*, 7(4), 453-464.

Taberlet, P., y Bouvet, J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 255(1344), 195-200.

Tan, A. M., y Wake, D. B. (1995). MtDNA phylogeography of the California newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4(4), 383-394.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on December 2015

Theodosius Dobzhansky (1973) Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution,

Ujvari, B., Downton, M., y Madsen, T. (2008). Population genetic structure, gene flow and sex-biased dispersal in frillneck lizards (*Chlamydosaurus kingii*). *Molecular Ecology*, 17(15), 3557-3564.

van de Vliet, M.S., Beebe, T.J., Diekmann, O.E., (2012). Genetic evidence for a distinct *Pelodytes* lineage in southwest Portugal: implications for the use of pre-developed microsatellite markers. *Conserv. Genet.* 13, 605–611.

Veith, M., Fromhage, L., Kosuch, J., Vences, M., (2006). Historical biogeography of Western Palearctic pelobatid and pelodytid frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Contributions to Zoology* 75, 109–120.

Vernesi, C., Pecchioli, E., Caramelli, D., Tiedemann, R., Randi, E., y Bertorelle, G. (2002). The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the Alps and central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology*, 11(8), 1285-1297.

Wake, D. B., Roth, G., y Wake, M. H. (1983). On the problem of stasis in organismal evolution. *Journal of theoretical Biology*, 101(2), 211-224.

Wallace AR (1958) On the tendency of species to form varieties; and on the perpetuation of varieties and species by natural means of selection. III. On the tendency of varieties to depart indefinitely from the

original type. *Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London* 3, 53-62.

Wallis, G. P., y Arntzen, J. W. (1989). Mitochondrial-DNA variation in the crested newt superspecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution*, 88-104.

Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* 15, 1419-1439.

Webb, T. I. I. I., y Bartlein, P. J. (1992). Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 141-173.

Weiss, S., Ferrand, N., 2007. Phylogeography of Southern European Refugia. Springer, Netherlands.

Weiss, S., Persat, H., Eppe, R., Schlötterer, C., y Uiblein, F. (2002). Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Molecular Ecology*, 11(8), 1393-1407.

Whittaker JC, Harbord RM, Boxall N *et al.* (2003) Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, 164, 781.

Wiley, E. O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Biology*, 27(1), 17-26.

Williams PH, Humphries C, Araujo MB, Lampinen R, Hagemeyer W, Gasc J-P, Mitchell-Jones T (2000) Endemism and important areas for representing European biodiversity: a preliminary exploration of atlas data for plants and terrestrial vertebrates. *Belgian Journal of Entomology* 2, 21-46.

Zeisset, I., y Beebee, T. J. C. (2008). Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, 101(2), 109-119.

Zhang DX., Hewitt GM., (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 12, 563-584.

Zink, R. M., y Barrowclough, G. F. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular ecology*, 17(9), 2107-2121.

CAPÍTULO 1: Evidencia molecular de especies candidatas crípticas en los *Pelodytes* ibéricos

Molecular evidence for cryptic candidate species in Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). Díaz-Rodríguez, J.^{a,b}, Gonçalves, H.^a, Sequeira, F.^a, Sousa-Neves, T.^a, Tejedo, M.^b, Ferrand, N.^{a,c} & Martínez-Solano, I.^{a,d,e,*} (2015). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 224–241.

^a CIBIO-InBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão, Universidade do Porto, 4485-661 Vairão, Portugal

^b Department of Evolutionary Ecology, Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Avenida Américo Vespucio, s/n, 41092 Sevilla, Spain

^c Departamento de Zoologia e Antropologia – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 4099-002 Porto, Portugal

^d Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM). Ronda de Toledo, s/n, 13005 Ciudad Real, Spain

^e Ecology, Evolution and Development Group, Department of Wetland Ecology, Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Avenida Américo Vespucio, s/n, 41092 Sevilla, Spain

* Corresponding author: E-mail: inigomsolano@gmail.com. Present address: Department of Wetland Ecology, Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Avenida Américo Vespucio, s/n, 41092 Sevilla, Spain. Phone: +34 954 232 340 ext. 1028; Fax: +34 954 621 125.

Abstract

Species delineation is a central topic in evolutionary biology, with current efforts focused on developing efficient analytical tools to extract the most information from molecular data and provide objective and repeatable results. In this paper we use a multilocus dataset (mtDNA and two nuclear markers) in a geographically comprehensive population sample across Iberia and Western Europe to delineate candidate species in a morphologically cryptic species group, Parsley frogs (genus *Pelodytes*). *Pelodytes* is the sole extant representative of an ancient, historically widely distributed anuran clade that currently includes three species: *P. caucasicus* in the Caucasus; *P. punctatus* in Western Europe, from Portugal to North-Western Italy; and *P. ibericus* in Southern Iberia. Phylogenetic analyses recovered four major well-supported haplotype clades in Western Europe, corresponding to well demarcated geographical subdivisions and exhibiting contrasting demographic histories. Splitting times date back to the Plio-Pleistocene and are very close in time. Species-tree analyses recovered one of these species lineages, corresponding to *P. ibericus* (lineage B), as the sister taxon to the other three major species lineages, distributed respectively in: western Iberian Peninsula, along the Atlantic coast and part of central Portugal (lineage A); Central and Eastern Spain (lineage C); and North-eastern Spain, France and North-western Italy (lineage D). The latter is in turn subdivided into two sub-clades, one in SE France and NW Italy and the other one from NE Spain to NW France, suggesting the existence of a Mediterranean-Atlantic corridor along the Garonne river. An information theory-based validation approach implemented in SpedeSTEM supports an arrangement of four candidate species, suggesting the need for a taxonomic revision of Western European *Pelodytes*.

Keywords: *Species delineation, Species trees, Systematics, Amphibians, Iberian Peninsula, Pelodytes*

1. Introduction

Species delineation, or the grouping of individuals and populations into discrete lineages based on different sets of data and operational criteria, remains one of the central topics in evolutionary biology (Wiens, 2007; Fujita *et al.*, 2012). With the recent and rapid progress of DNA sequencing technologies, the field has quickly shifted focus from issues related to quantity and quality of data (e.g., identification of diagnostic characters, assessment of congruence across datasets) towards the development of more efficient analytical tools. This implies extracting the most information from molecular data, integrating it with morphological, biogeographic and ecological information, thus providing objective, repeatable and robust results in the form of well demarcated, independently evolving lineages that are considered candidate species amenable to further hypothesis testing (Leaché *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011; Camargo *et al.*, 2012; Ahrens *et al.*, 2013; Carstens *et al.*, 2013; Edwards and Knowles, 2014). New developments in the field are related to widespread acceptance of de Queiroz's definition of species as "separately evolving metapopulation lineages" (de Queiroz, 2007) and the conceptual shift from gene-tree to species-tree inference, which has transformed the field of molecular systematics (Edwards *et al.*, 2007; Edwards, 2009).

Some of the most challenging systems for delineation of evolutionarily independent lineages include relatively young, morphologically cryptic species groups, where lack of diagnostic characters and conflict between datasets complicates attempts to delineate lineages and infer species trees (Bickford *et al.*, 2007; Weisrock *et al.*, 2010; Florio *et al.*, 2012; Puillandre *et al.*, 2012; Barley *et al.*, 2013). While examples are widespread across many taxonomic groups, amphibians are particularly well represented because, in general, they are morphologically similar and high historical effective population sizes and/or incomplete reproductive isolation often yield conflicting gene trees (Vences and Wake, 2007; Fontenot *et al.*, 2011; Sequeira *et al.*, 2011; Martínez-Solano *et al.*, 2012; Fouquet *et al.*, 2013; Barrow *et al.*, 2014). The widespread use of molecular markers since the 90's uncovered high levels of "cryptic" amphibian diversity, especially in the tropics (e.g., Fouquet *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2012), but also in the more extensively studied temperate regions, notably in areas that acted as glacial refugia during the Pleistocene, like the Iberian Peninsula (Hewitt, 2004; Weiss and Ferrand, 2007; Recuero *et al.*, 2012; Stöck *et al.*, 2012).

An interesting case study is represented by Eurasian Parsley frogs (genus *Pelodytes*), including three extant species, one in the Caucasus (*P. caucasicus*), and two in Western Europe: *P. punctatus*, distributed throughout most of the Iberian Peninsula and also present in France and coastal northwestern Italy (Denöel *et al.*, 2013), and the Iberian endemic *P. ibericus* (Barbadillo, 2002). According to the fossil record, *Pelodytes* has a long history in Western Europe, where it was widely distributed (see review in Martín and Sanchiz, 2014), including fossil taxa (*Pelodytes arevacus*) dating back to the Miocene (9.7-22.5 million years –myr– ago, Sanchiz, 1978, 1998; Martín and Sanchiz,

2014) and closely resembling extant Iberian species in osteological characters (Sanchiz *et al.*, 2002). Fossils morphologically ascribed to *P. punctatus* that are at least 3.2 myr old have been reported in southeastern France (Blain, 2009). Therefore, and taking into account the role of the Iberian Peninsula as a hotspot for inter- and intraspecific differentiation across a large number of taxa (Abellán and Svenning, 2014), additional opportunities for speciation in Iberian *Pelodytes* may have existed, and current species diversity may be underestimated. In fact, a recent study suggested the existence of additional, cryptic species in southwestern Iberia (van de Vliet *et al.*, 2012).

In the present study we use DNA sequences from a comprehensive sample of 384 individuals from 160 Iberian populations to delineate major independently evolving lineages in *Pelodytes* through a combination of discovery and validation species-delineation approaches. Our results indicate the existence of additional candidate species in the genus, help to identify their contact zones and provide new insights into the timing and geography of their diversification.

2. Material and methods

2.1 Sampling and DNA extraction

We sampled one to 12 individuals per population in a total of 160 localities spread across the extant ranges of *P. punctatus* and *P. ibericus*, including seven individuals of *P. caucasicus* that were used as outgroup (Fig. 1, Table 1). A total of 391 individuals (including the outgroup) were used for subsequent molecular analyses (Table 1). Tissue samples were obtained from either tail tips of larvae and/or toe tips of adults and preserved in 70% ethanol or frozen. Whole genomic DNA was extracted using the commercial DNA extraction kit Dneasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturers' instructions or with the standard high-salt protocol of Sambrook *et al.* (1989).

2.2 Molecular markers, amplification and sequencing

Four markers, including two mitochondrial (mtDNA) and two nuclear (nDNA) gene fragments were analyzed: 705 bp of *cob*, 788 bp of *nad4* (including adjacent tRNAs), a fragment of 393 bp of *PPP3CAint4*, and 752 bp of *β-fibint7*. All markers were amplified via the polymerase chain reaction (PCR) using the following combination of primers and PCR thermal cycling conditions. For *cob*, reactions were performed with primers “L14724” (Irwin *et al.*, 1991), and “MVZ16” (Moritz *et al.*, 1992) with initial denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles with a denaturing temperature of 92 °C (40 s), annealing at 47 °C (1 min), and extension at 72 °C (1 min and 20 s) followed by final extension at 72 °C for 5 min. For *nad4* we used primers ND4 and Leu, previously described by Arevalo *et al.* (1994), with an initial denaturation at 94 °C (5 min); followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C

(40 s), annealing at 56 °C (1 min), extension at 72 °C (1 min and 20 s); and final extension of 72 °C for 5 min. Additionally, sequences of *PPP3CAint4* were amplified with PCR conditions described by Pinho *et al.* (2010), consisting of an initial denaturation at 94 °C for 3 min; 40 cycles with a denaturing temperature of 94 °C (30 s), annealing at 53 °C (1min), and extension at 72 °C (1 min and 30 s), with a final extension at 72 °C for 5 min. Amplified fragments were sequenced in both directions. For *β-fibint7* a two-step amplification procedure was used, with a combination of two primer pairs (PCR1: FIBX7 and FIBX8; PCR2: BFXF and BFXR) as described by Sequeira *et al.* (2006), with an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturing at 94 °C (40 s), annealing at 50 °C (PCR1) and 56 °C (PCR2), (1 min), extension at 72 °C (1min 30 s) and a final extension of 72 °C for 5 min. Amplified fragments of PCR2 were also sequenced in both directions using the primers BFXF and BFXR. In both nuclear markers, indels present only in the outgroup and regions in the alignment that could not be unambiguously edited or aligned due to the presence of short repeats were excluded prior to further analyses (reported alignment sizes take into account exclusion of these sites).

PCRs were performed in a total volume of 10 µl, including 0.1 µl Taq polymerase (5 U/µl Biotaq® and Bioline DNA Polymerase); 0.1 µl BSA (20 mg/ml); 0.5 µl of each primer (5 µM); 0.1 µl dNTPs (25 mM); and 0.3 µl of MgCl₂ (50 mM) plus 1 µl of reaction Buffer. For *PPP3CAint4*, PCRs were performed in a total volume of 10 µl, including 0.1 µl of EcoTaq polymerase (5 U/µl Taq DNA Polymerase, EcoGen); 0.3 µl of each primer (10 µM); 0.5 µl dNTPs (40 µM); and 0.5 µl of MgCl₂ (50 mM) plus 1 µl of reaction Buffer NH3 (Bioline).

After PCR products were purified with Montage PCR columns (Millipore), samples were cycle-sequenced using ABI Prism Big Dye Terminator Cycle in an ABI PRISM® 310 automated sequencer (Applied Biosystems) following the manufacturers' instructions.

2.3. Lineage identification and delineation

Sequences were checked by eye, edited and aligned using the program Bioedit version 7.2.5 (Hall, 1999). All sequences generated for this study are deposited in GenBank under Accession Nos. KP165846-KP167135 (Table 1). Polymorphic positions corresponding to heterozygous individuals in nuclear loci were coded with IUPAC ambiguity codes. Haplotypes were phased using PHASE v2.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens and Donnelly, 2003), using SeqPHASE (Flot, 2010) to format the input files. Length variant heterozygotes (LVHs), which resulted from the amplification of alleles with different sizes from a single individual, were phased interpreting directly the mixed trace in the electropherogram formed by the two allelic peaks superimposed onto each other downstream of the

indel (e.g. Sousa-Neves *et al.*, 2013). All known haplotypes were incorporated for subsequent haplotype inference. We accepted haplotypes with a minimum probability of 0.9.

We performed phylogenetic analyses in MrBAYES v3.2.1 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist *et al.*, 2012) to estimate relationships between mtDNA and nDNA haplotypes. Full alignments were collapsed into haplotypes using the online tool Fabox (Villesen, 2007). For the mtDNA dataset, we used PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012) to choose the optimal partitioning strategy. Best support was obtained for three partitions, corresponding to first positions in *cob* and *nad4* and the fragment containing the tRNAs; second positions in *cob* and *nad4*; and third positions in *cob* and *nad4*. Analyses in MrBAYES were set to explore the full GTR parameter space in each of the three partitions using the commands `nst=mixed rates=invgamma`. Convergence of results was assessed by examination of values of the standard deviation of split frequencies across runs and visual inspection of parameter values during the run in Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014).

Genealogical relationships among haplotypes for each locus were estimated using phylogenetic algorithms as implemented in Haploviewer (Salzburger *et al.*, 2011). Phylogenetic relationships among haplotypes for each locus were estimated using a Maximum Likelihood (ML) approach, as implemented in the software RAxML v.7.0.4 (Silvestro & Michalak, 2010), using the graphical front-end RAxML GUI v.0.93 (Randomized Accelerated Maximum Likelihood; Stamatakis, 2006). Using default options we ran the program with the best fit model for each locus as selected by PartitionFinder v0.9 (Lanfear *et al.*, 2012) under the Akaike information criterion (AIC; Akaike, 1973), and the generated trees were used to estimate each haplotype network.

We assessed probability of recombination in nuclear sequences with TOPALi v2.5 (Milne *et al.*, 2004), using the difference of sums of squares (DSS) method with a sliding window of 100-bp and 10-bp step size, and also with the PhiTest implemented in Splitstree v4.2 (Huson and Bryant, 2006).

Four major lineages of Iberian *Pelodytes* were recovered in previous analyses (see results below) and for each of them, several genetic diversity parameters were estimated. In addition, we performed a pairwise mismatch distribution analysis (Rogers and Harpending, 1992), and calculated several statistics including Tajima's D (Tajima, 1989), Ramos-Onsins and Rozas' R^2 (Ramos-Onsins and Rozas, 2002) and Fu's F_s (Fu, 1997) to test for signatures of demographic expansion in each of the four lineages using DnaSP v 5.10 (Librado and Rozas, 2009). Genetic distances (p-uncorrected) within and between species lineages were calculated with Mega6 (Tamura *et al.*, 2011).

Species trees were reconstructed based on two different methodologies. First, we used the coalescent-based method implemented in *BEAST (Heled and Drummond, 2010). We used a Yule speciation prior with strict molecular clock. Each marker was analyzed as an independent partition, with nucleotide substitution models selected by jModeltest v 2.1.1, based on the Bayesian Information

Criterion (Darriba *et al.*, 2012). Tree topologies and molecular clocks across partitions were unlinked. We specified a lognormal prior for the substitution rate of the mtDNA partition with a mean of 0.0075 substitutions/site/myr and a standard deviation of 0.2, encompassing values typically reported in the literature (see for example Recuero *et al.*, 2012). Three independent analyses were run for one hundred million generations and trees and other parameters were sampled every 10,000 generations. Traces were visualized in Tracer v 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) to check for adequate mixing and convergence of results across runs, and log and treefiles were subsequently combined. Additionally, we used the pseudo-likelihood approach implemented in MP-EST v. 1.3 (Liu *et al.*, 2010) to infer the *Pelodytes* species tree. To estimate branch support, 1,000 replicate gene trees for each marker (taken from the post burn-in sample of trees from a MrBAYES run, see above) were subjected to MP-EST analyses to derive bootstrap proportions of inferred clades in the species tree. MP-EST analyses were run in the STRAW server (Shaw *et al.*, 2013). Both *BEAST and MP-EST attribute gene-tree discordance to incomplete lineage sorting and do not take into account gene flow across population lineages; therefore, individuals and populations identified as admixed based on inspection of the mtDNA tree and nDNA haplotype networks (see results below) were excluded from the datasets prior to analyses. All other individuals from populations where mtDNA haplotypes from different lineages were found in sympatry were also excluded.

2.4. Validation approach

We used SpedeSTEM (Ence and Carstens, 2011) as a validation approach to evaluate support for the previously identified candidate species. SpedeSTEM calculates the likelihood of multiple arrangements of putative evolutionary lineages based on externally generated gene trees and ranks them by model probability using information theory. Gene trees were estimated by maximum-likelihood inference in Garli v 0.951 (Zwickl, 2006) using alignments with a single representative per haplotype (excluding admixed populations, as in previous analyses). We used a weighted average across loci calculated in DnaSP as the estimate for theta (theta= 0.03093), with a scaling (variable sites/total sites) of 1:0.47:0.32 for mtDNA, *β -fibint7* and *PPP3CAint4*, respectively. *Pelodytes caucasicus* was used as outgroup, with the remaining samples divided into two major groups corresponding to *P. ibericus* and *P. punctatus*, with the latter subdivided into the three lineages recovered in previous analyses. Analyses were run online in the SpedeSTEM server at: <https://spedestem.osu.edu/runspedestem>.

3. Results

Amplification of the two mtDNA fragments was successful in 367 individuals (including seven outgroup samples, Table 1), yielding an alignment of 1493 bp with 155 unique haplotypes (375 variable sites, 321 parsimony-informative). Additionally, 139 individuals (278 phased sequences) from the ingroup plus two from the outgroup were sequenced for *PPP3CAint4* (393 bp) and *β-fibint7* (752 bp). Different individuals were sequenced for each nuclear marker (see Table 1). An A+T-biased content (70%) was observed in *PPP3CAint4* sequences, which is consistent with values reported for this marker in other species (according to Pritchko and More, 1997, this feature of A-T rich sequences is a peculiarity of non-coding regions that are not under functional constraint). There were 23 unique haplotypes in *PPP3CAint4* (25 variable sites, 13 parsimony-informative); and 40 haplotypes in *β-fibint7* (45 polymorphic sites, 31 parsimony-informative). Table 1 lists individuals sequenced for each marker. We did not find significant evidence of recombination in the nuclear markers.

Phylogenetic analyses of mtDNA data recovered a well-resolved tree with four major haplotype clades (labeled A to D), with a strong association with geography (Figs. 1 and 2). Clade B corresponds to *P. ibericus*, whereas the remaining clades (A, C and D) are ascribed to *P. punctatus*: A is distributed in the south-west of the Iberian Peninsula, along the Atlantic coast and part of central Portugal; C occupies central and eastern Spain; and D is present in north-eastern Spain, France and north-western Italy. All four major clades are well supported by Bayesian Posterior Probabilities (BPP) of 0.99-1.0. Clade D is subdivided in two well-supported sub-clades, one containing samples from NW Italy and SE France (localities 152 to 157, BPP: 1.0) and the other with the remainder of samples (BPP: 0.99). Clades A, C and D form a monophyletic group (BPP: 0.96), with D being the sister taxon to (A+C), although with moderate support (BPP: 0.86). In some populations, we found haplotypes of different clades co-occurring (Table 1 and Fig. 1). These include localities 17-21 (clades A + B), and 75, 88 (clades B+C). We found no localities with mtDNA haplotypes of clades C+D occurring in sympatry.

Estimates of genetic diversity and intra- and interpopulation genetic distance are shown in Tables 2 and 3, respectively. For mtDNA, we found moderate levels of genetic diversity in haplotype clades B and C, with higher values of haplotype and nucleotide diversity in clades A and D. Mismatch distribution plots revealed a clearly unimodal pattern in clades A, B and C, suggesting demographic expansion (Fig. S1). This is in accordance with significant values of Tajima's D, Fu's Fs and Ramos-Onsins & Rozas' R² statistics in the same clades (Table 2). In contrast, clade D exhibits a multimodal mismatch distribution, with no significant values for any statistic, suggesting demographic stability or genetic substructuring. The average number of pairwise sequence differences (p-uncorrected distance) between clades ranged from 3.3% to 4.4% (Table 3), whereas between each of the Iberian clades and *P. causicus* the values ranged from 15.7-16.8%. Within clades, p-distances were higher in clade D

(0.64%) than in the other clades (0.12-0.37%, Table 3). We interpret haplotype clades A-D to diagnose four species lineages.

Haplotype networks based on mtDNA and nuclear sequences are shown in Fig. 3. In mtDNA, lineages B and C exhibit star-like topologies, with one high frequency, central haplotype and several additional haplotypes connected by one-step mutations, again suggesting recent demographic expansion. The most frequent haplotype in lineage B was present in 42 out of 94 sequences and was widely distributed, with 23 haplotypes occurring only once and 10 additional haplotypes with frequencies 2-9. The most frequent haplotype in lineage C occurred in 50 out of 151 individuals from the center and east of the Iberian Peninsula, with 37 haplotypes with a frequency of 1 and an additional 17 haplotypes with frequencies 2-9. Lineage A was subdivided into two main haplotype groups, one of them largely distributed in central (Setúbal, Lisboa and Santarém) and Northern Portugal (Porto and Coimbra), and the other geographically restricted to the south (Faro). We found 42 haplotypes in this lineage, with a highest frequency of 15 and 30 haplotypes observed only once. Finally, lineage D includes two major haplotype groups: a) from Catalonia to Northwestern France; and b) from Southern France (Provence-Côte D'Azur) to Northern Italy (Liguria). We found a total of 20 haplotypes in this lineage, with frequencies ranging from 1-6. Nuclear networks were congruent with mtDNA, with four major haplotype groups in each marker (Fig. 3), but we also detected the presence of heterozygous individuals with alleles clustering with different lineages, especially in areas of close geographic proximity between them (lineages A+B: populations 17, 18, 21; lineages B+C: population 88; lineages C+D: population 143, see Table 1 and Fig. 1). Some individuals had mtDNA haplotypes characteristic of one lineage and nuclear alleles of a different lineage (lineages C+D, populations 143, 144, 150, Table 1, Fig. 1).

Species tree analyses recovered concordant, robust topologies, with *P. ibericus* (lineage B) being the sister taxon to a clade including the other three major lineages (BPP: 0.89, bootstrap support – Bs: 100), with lineage D being the sister taxon to (A+C) (BPP: 0.75; Bs: 87.6). According to *BEAST results, major speciation events in Iberia were concentrated in the Pliocene and Lower Pleistocene (Fig. 4). Median and 95% highest posterior density intervals (HPDs) for inferred splits were 3.63 (2.07-5.50) myr (*P. ibericus* vs. lineages A, C and D; 2.91 (1.68-4.51) myr for lineage D vs. lineages A+C; and 2.86 (1.54-4.48) myr for lineages A and C (Fig. 4).

The SpedeSTEM-based validation approach provided the highest support for the four-lineage arrangement (Table 4), supporting their qualification as candidate species (*P. ibericus* plus three candidate species, one of which would retain the name *P. punctatus*, see Discussion).

4. Discussion

Initial attempts at probabilistic, molecular-based species delineation were received with criticism (Bauer *et al.*, 2011; Fujita and Leaché, 2011), but in a short time these methods have become more popular. However, they have not replaced character-based species descriptions, and thus the lineages identified in species delineation analyses are best treated as candidate species, or species hypotheses amenable to further testing with as many different sources of evidence as possible. Our approach, based on multilocus analyses of a comprehensive sample, consistently recovered four historical lineages in Iberian *Pelodytes*, showing strong geographic structuring (lineages A-D, Figs. 1-4). Of these, one corresponds to *Pelodytes ibericus* (lineage B), which has been shown to differ in morphological, osteological, behavioral (mating calls), and molecular characters from populations ascribed to *P. punctatus* (Sánchez-Herráiz *et al.*, 2000; Sanchiz *et al.*, 2002; Pargana *et al.*, 2003; García-París *et al.*, 2003; Veith *et al.*, 2006). In our analyses, *P. ibericus* is also recovered as diverging from the rest of the Iberian lineages around 3.6 myr ago, in accordance with previous estimates based on allozymes and mtDNA data (3.3-3.8 myr, see Sánchez-Herráiz *et al.*, 2000; Sanchiz *et al.*, 2002; García-París *et al.*, 2003). Contact zones with lineages A and C have been approximately identified (Fig. 1), and further fine-scale sampling coupled with detailed analysis using a large set of fast-evolving nuclear markers (microsatellites or single nucleotide polymorphisms) will be of crucial importance to assess the extent of reproductive isolation across lineages (which is incomplete, as shown by our observation of several instances of cyto-nuclear discordance; see also van de Vliet *et al.*, 2012, where boundaries between lineages A and B slightly differ from our results).

The second most differentiated lineage (lineage D) includes all populations north of the Pyrenees, and since it includes the type locality of *P. punctatus* ("aux environs de Beauvais", Department Oise, northern France: Daudin, 1802) it would retain this name. Two sub-clades were strongly supported in phylogenetic analyses of mtDNA sequences. One of these groups includes populations in SE France and NW Italy, whereas the other one is more widely distributed from NE Spain (Catalonia) to northern France. Remarkably, there is little genetic differentiation in this second sub-clade. The pattern of haplotypic diversity, with more haplotypes in populations south of the Pyrenees, suggests a rapid, recent expansion, probably along the Garonne river basin, which provides a corridor connecting the Atlantic and Mediterranean coasts of France. The genetic distinctiveness of these populations had previously been noted by Sánchez-Herráiz *et al.* (2000) and García-París *et al.* (2003). Relatively high levels of genetic diversity in lineage D are consistent with a long fossil record, possibly dating back to 3.2 myr ago (Sète, see Blain, 2009). Further research is needed to delineate the contact zone with lineage C, although the finding of instances of cyto-nuclear discordance in populations 143, 144 and 150 suggests a wide area of admixture. Surprisingly, haplotypes of lineages

C and D were never found in sympatry, although this may be an artifact of sparser sampling at the potential contact zone.

Lineage A is endemic to Portugal, with populations all along its Atlantic coast. Genetic distinctiveness of populations in this area was initially reported by Pargana (1998), who also noted differences in bioacoustic parameters, and more recently by van de Vliet *et al.* (2012), who reported strong cross-amplification failure in microsatellite markers developed from samples in SW Portugal when tested in samples from northern Spain (which would correspond to lineage C in our study, see Fig. 1). The existence of well-differentiated lineages in SW Portugal has been previously reported for other amphibian species, like *Salamandra salamandra*, *Lissotriton boscai* or *Alytes cisternasii* (Reis *et al.*, 2011; Martínez-Solano *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2009). The addition of *Pelodytes* to an increasing group of taxa with important genetic reservoirs in this region makes it one of the key Iberian “refugia within refugia” (Gómez & Lunt, 2007; Abellán and Svenning, 2014). The existence of putative Pleistocene glacial refugia in Southern Portugal, Spain and France, on the basis of our data and previous studies with other taxa, has strong implications for regional conservation planning. Understanding cryptic diversity is a concern as amphibian habitat, temporary ponds in traditional Mediterranean farmland, is disappearing at a fast rate (Ferreira and Beja, 2013).

Finally, lineage C is the most widespread in Iberia, with populations in the two major plateaus in central Spain. The presence of *Pelodytes* in the Northern Plateau dates back at least to the Early Pleistocene in Atapuerca (Cuenca-Bescós *et al.*, 2010) and is relatively well documented in other (more recent) sites within the current range of this lineage (for example, see Blain *et al.*, 2007, 2011). In spite of this, levels of genetic diversity are comparatively low in this lineage, and with lineage B (*P. ibericus*), it is the only one where all tests of demographic expansion were significant (Table 2, Fig. S1). The harsher climatic conditions of central Spain may have subjected *Pelodytes* populations to strong demographic fluctuations through time, although it remains unclear what circumstances governed long-term demographic trends in *P. ibericus*. Species distribution models (SDMs) are a powerful tool to identify potential differences across lineages in their ecological niche, which may have been important in the speciation process (Fitze *et al.*, 2011). However, a recent approach to examining functional divergence between lineages A, B and C revealed weak differentiation in thermal physiology (M. Katzenberger, J. Díaz-Rodríguez, H. Duarte, J.F. Beltrán and M. Tejedo, unpublished data).

Molecular-based species delimitation approaches are rapidly becoming popular in molecular systematics because they allow rapid and objective identification of major historical lineages as candidate species. Results of our species-delimitation approach suggest that species diversity in Iberian *Pelodytes* may be currently underestimated, with up to two additional lineages that may warrant recognition as new species. More detailed analyses of contact zones, as well as morphological

and ecological comparisons of populations representing all major lineages are underway in order to provide robust evidence supporting (or rejecting) these species hypotheses.

Acknowledgments

For technical support during lab work we thank Susana Lopes, C. Pinho, M.J. Fernández Benítez and Bruno Carvalho. We also thank E. Albert, J.W. Arntzen, E. Ayllón, M. Barbosa, A. Bermejo, M. Berroneau, W. Böhme, G. Caballero, D. Canestrelli, T. Couturier, E.G. Crespo, D. Donaire, L. García, M. García París, P. Geniez, I. Gómez Mestre, J. P. González, E.G. González, A. Gosá, J. Gutiérrez, P. Hernández, A. Montori, J.C. Monzó, N. Oromí, B. Paños, P. Pavón, E. Recuero, V. Sancho, I. Urbán, A. Valdeón and M. Veith for sharing samples and/or help during fieldwork. A. Sánchez Vialas kindly provided pictures of individuals of lineages A and D, and Godfried Schreur and Ana Cordero, of lineage B (*P. ibericus*). This work was supported through Project “Genomics and Evolutionary Biology” cofinanced by North Portugal Regional Operational Programme 2007/2013 (ON.2 – O Novo Norte), under the National Strategic Reference Framework (NSRF), through the European Regional Development Fund (ERDF); the Program Operacional Factores de Competitividade (COMPETE), and by national funds from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), through the research Projects PTDC/BIA-BEC/099915/2008 and PTDC/BIA-BEC/105083/2008 to HG and FS, respectively; and by partial funds provided by grants CGL2008-04271-C02-01/BOS and CGL2011-28300 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, and FEDER) and PPII10-0097-4200 (Junta de Comunidades de Castilla la Mancha and FEDER) to IMS, who is currently funded by Project “Biodiversity, Ecology and Global Change”, co-financed by North Portugal Regional Operational Programme 2007/2013 (ON.2–O Novo Norte), under the National Strategic Reference Framework (NSRF), through the European Regional Development Fund (ERDF). Additional funds were provided by grants: “Anfibios Endémicos de Andalucía” (Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Spain), and CGL2005-02931/BOS (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain) to MT. JDR is supported by a PhD grant from FCT (SFRH/BD/70631/2010), HG and FS are supported by postdoctoral grants from FCT (SFRH/BPD/26555/2006 and SFRH/BPD/87721/2012, respectively) and TSN by a research grant (BI) from ICETA/UP.

References

- Abellán, P., Svenning, J.C., 2014. Refugia within refugia—patterns in endemism and genetic divergence are linked to Late Quaternary climate stability in the Iberian Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society* 113, 13–28.
- Ahrens, D., Fabrizi, S., Šipek, P., Lago, P.K., 2013. Integrative analysis of DNA phylogeography and morphology of the European rose chafer (*Cetonia aurata*) to infer species taxonomy and patterns of postglacial colonisation in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69, 83–94.
- Akaike, H., 1973. Information theory as an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B.N., Csaki, F. (Eds.), *Second International Symposium of Information Theory*. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.
- Arévalo, E., Davis, S.K., Sites, J.W., 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Syst. Biol.* 43, 387–418.
- Bauer, A.M., Parham, J.F., Brown, R.M., Stuart, B.L., Grismer, L., Papenfuss, T.J., Böhme, W., Savage, J.M., Carranza, S., Grismer, J.L., Wagner, P., Schmitz, A., Ananjeva, N.B., Inger, R.F., 2011. Availability of new Bayesian-delimited gecko names and the importance of character-based species descriptions. *Proc. Biol. Sci.* 278, 490–492.
- Barbadillo, L.J., 2002. *Pelodytes ibericus*. In: *Atlas de distribución y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. eds. J. M. Pleguezuelos, R. Márquez, and M. Lizana, p. 97-99. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- Barley, A.J., White, J., Diesmos, A.C., Brown, R.M., 2013. The challenge of species delimitation at the extremes: diversification without morphological change in Philippine sun skinks. *Evolution* 67, 3556–3572.
- Barrow, L.N., Ralicki, H.F., Emme, S.A., Lemmon, E.M., 2014. Species tree estimation of North American chorus frogs (Hylidae: *Pseudacris*) with parallel tagged amplicon sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75, 78–90.
- Bickford, D., Lohman, D., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 148–155.

- Blain, H.A., 2009. Contribution de la paléoherpétofaune (Amphibia & Squamata) à la connaissance de l'évolution du climat et du paysage du Pliocène supérieur au Pléistocène moyen d'Espagne. *Treb. Mus. Geol. Barcelona* 16, 39-170.
- Blain, H., Bailon, S., Agustí, J., 2007. Anurans and squamate reptiles from the latest Early Pleistocene of Almenara-Casablanca-3 (Castellón, East of Spain). Systematic, climatic and environmental considerations. *Geodiversitas* 29, 269-295.
- Blain, H.-A., López-García, J.M., Cuenca-Bescós, G., 2011. A very diverse amphibian and reptile assemblage from the late Middle Pleistocene of the Sierra de Atapuerca (Sima del Elefante, Burgos, Northwestern Spain). *Geobios* 44, 157-172.
- Camargo, A., Morando, M., Avila, L.J., Sites, J.W., Jr, 2012. Species delimitation with ABC and other coalescent-based methods: a test of accuracy with simulations and an empirical example with lizards of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae). *Evolution* 66, 2834-2849.
- Carstens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M., Satler, J.D., 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22, 4369-4383.
- Cuenca-Bescós, G., Rofes, J., López-García, J.M., Blain, H.-A., De Marfá, R., Galindo-Pellicena, M.A., Bennàsar, M., Melero-Rubio, M., Arsuaga, J.L., Bermúdez de Castro, J.M., Carbonell, E., 2010. Biochronology of Spanish Quaternary small vertebrate faunas. *Quaternary International* 212, 109-119.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.
- Daudin, F.-M., 1802 "An. XI". *Histoire Naturelle des Rainettes, des Grenouilles et des Crapauds*. Quarto version. Paris: Levrault.
- Denoël, M., Beja, P., Andreone, F., Bosch, J., Miaud, C., Tejedo, M., Lizana, M., Martínez-Solano, I., Salvador, A., García-París, M., Recuero Gil, E., Marquez, R., Cheylan, M., Diaz Paniagua, C., Pérez-Mellado, V., 2009. *Pelodytes punctatus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Accessed June 09 2014.
- de Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879-886.
- Edwards, S.V., 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution* 63, 1-19.
- Edwards, S.V., Liu, L., Pearl, D.K., 2007. High-resolution species trees without concatenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 5936-5941.
- Edwards, D.L., Knowles, L.L., 2014. Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 20132765.
- Ence, D.D., Carstens, B.C., 2011. SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. *Molecular Ecology Resources* 11, 473-480.
- Ferreira, M., Beja, P., 2013. Mediterranean amphibians and the loss of temporary ponds: are there alternative breeding habitats? *Biological Conservation* 165, 179-186.
- Fitze, P.S., Gonzalez-Jimena, V., San-Jose, L.M., San Mauro, D., Aragon, P., Suarez, T., Zardoya, R., 2011. Integrative analyses of speciation and divergence in *Psammotromus hispanicus* (Squamata: Lacertidae). *BMC Evol Biol* 11, 347.
- Florio, A.M., Ingram, C.M., Rakotondravony, H.A., Louis, E.E., Raxworthy, C.J., 2012. Detecting cryptic speciation in the widespread and morphologically conservative carpet chameleon (*Furcifer lateralis*) of Madagascar. *Journal of Evolutionary Biology* 25, 1399-1414.
- Flot, J.-F., 2010. SeqPHASE: a web tool for interconverting PHASE input/output files and FASTA sequence alignments. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 162-166.
- Fontenot, B.E., Makowsky, R., Chippindale, P.T., 2011. Nuclear-mitochondrial discordance and gene flow in a recent radiation of toads. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59, 66-80.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., Gemmill, N.J., 2007. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2, e1109.
- Fouquet, A., Santana Cassini, C., Fernando Baptista Haddad, C., Pech, N., Trefaut Rodrigues, M., 2013. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography* 41, 855-870.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Fujita, M.K., Leaché, A.D., 2011. A coalescent perspective on delimiting and naming species: a reply to Bauer *et al.* *Proc. Biol. Sci.* 278, 493-495.
- Fujita, M.K., Leaché, A.D., Burbrink, F.T., McGuire, J.A., Moritz, C., 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 27, 480-488.
- Funk, W.C., Caminer, M., Ron, S.R., 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 1806-1814.
- García-París, M., Buchholz, D., Parra-Olea, G., 2003. Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28, 12-23.
- Gómez, A., Lunt, D., 2007. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. *Phylogeography in Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity* 155-188.
- Gonçalves, H., Martínez-Solano, I., Pereira, R.J., Carvalho, B.M., García-París, M., Ferrand, N., 2009. High levels of population subdivision in a morphologically conserved Mediterranean toad (*Alytes cisternasii*) result from recent, multiple refugia: evidence from mtDNA, microsatellites and nuclear genealogies. *Molecular Ecology* 18, 5143-5160.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.

- Heled, J., Drummond, A.J., 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol. Biol. Evol.* 27, 570–580.
- Hewitt, G.M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359, 183–195.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson A.C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32, 128–144.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701.
- Leaché, A.D., Koo, M.S., Spencer, C.L., Papenfuss, T.J., Fisher, R.N., McGuire, J.A., 2009. Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 12418–12423.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DNASP v5: a software for comprehensive analysis of polymorphism DNA data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Liu, L., Yu, L., Edwards, S.V., 2010. A maximum pseudo-likelihood approach for estimating species trees under the coalescent model. *BMC Evol. Biol.* 10, 302.
- Martín, C., Sanchiz, B., 2014. Lisanfos KMS. Version 1.2. Online reference accessible at <http://www.lisanfos.mncn.csic.es/>. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. Madrid, Spain. Accessed July 21 2014.
- Martínez-Solano, I., Teixeira, J., Buckley, D., García-París, M., 2006. Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology* 15, 3375–3388.
- Martínez-Solano, Í., Peralta-García, A., Jockusch, E.L., Wake, D.B., Vázquez-Domínguez, E., Parra-Olea, G., 2012. Molecular systematics of *Batrachoseps* (Caudata, Plethodontidae) in southern California and Baja California: mitochondrial-nuclear DNA discordance and the evolutionary history of *B. major*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63, 131–149.
- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshall, D.F., Husmeier, D., McGuire, G., 2004. TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* 20, 1806–1807.
- Moritz, C., Schneider, C.J., Wake, D.B., 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Syst. Biol.* 41, 273–291.
- Pargana, J. M. 1998. Características espectrais e temporais e correlações genéticas do canto de acasalamento de *Pelodytes punctatus* (Amphibia, Anura). Masters Thesis. Departamento de Biofísica. Universidade de Lisboa. 163 pp.
- Pargana, J.M., Marquez, R., Reques, R., Sánchez Herráiz, M.J., Tejedo, M., Crespo, E.G., 2003. The mating call of *Pelodytes ibericus* (Anura, Pelodytidae). *Herpetological Journal* 13, 199–204.
- Pinho, C., Rocha, S., Carvalho, B.M., Lopes, S., Mourao, S., Vallinoto, M., Brunes, T.O., Haddad, C.F.B., Gonçalves, H., Sequeira, F., 2010. New primers for the amplification and sequencing of nuclear loci in a taxonomically wide set of reptiles and amphibians. *Conserv. Genet. Resour.* 2, 181–185.
- Prychitko, T.M., Moore, W.S., 1997. The utility of DNA sequences of an intron from the b-fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 8, 193–204.
- Puillandre, N., Modica, M.V., Zhang, Y., Sirovich, L., Boisselier, M.C., Cruaud, C., Holford, M., Samadi, S., 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology* 21, 2671–2691.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J., 2014. Tracer v1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed Nov. 28 2014.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2092–2100.
- Recuero, E., Canestrelli, D., Vörös, J., Szabó, K., Poyarkov, N.A., Arntzen, J.W., Crnobrnja-Isailović, J., Kidov, A.A., Cogalniceanu, D., Caputo, F.P., Nascetti, G., Martínez-Solano, I., 2012. Multilocus species tree analyses resolve the radiation of the widespread *Bufo bufo* species group (Anura, Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62, 71–86.
- Reis, D.M., Cunha, R.L., Patrão, C., Rebelo, R., Castilho, R., 2011. *Salamandra salamandra* (Amphibia: Caudata: Salamandridae) in Portugal: not all black and yellow. *Genetica* 139, 1095–1105.
- Rivera, P.C., Di Cola, V., Martínez, J.J., Gardenal, C.N., Chiaraviglio, M., 2011. Species delimitation in the continental forms of the genus *Epicrates* (Serpentes, Boidae) integrating phylogenetics and environmental niche models. *PLoS ONE* 6, e22199.
- Rogers, A.R., Harpending H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552–569.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Salzburger, W., Ewing, G.B., Von Haeseler, A., 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20, 1952–1963.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sánchez-Herráiz, M., Barbadillo, L., Machordom, A., Sanchiz, B., 2000. A new species of pelodytid frog from the Iberian Peninsula. *Herpetologica* 56, 105–118.
- Sanchiz, B., 1978. Nuevos restos fósiles de la familia Pelodytidae (Amphibia, Anura). *Estudios Geológicos*, 34: 9–27.
- Sanchiz, B., 1998. *Salientia. Handbuch der Paläoherpetologie Pars 4*. Dr. F. Pfeil, Munich.

- Sanchiz, B., Tejedo, M., Sanchez-Herraiz, M., 2002. Osteological differentiation among Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Graellsia* 58, 35–68.
- Sequeira, F., Ferrand, N., Harris, D., 2006. Assessing the phylogenetic signal of the nuclear beta-fibrinogen intron 7 in salamandrids (Amphibia: Salamandridae). *Amphibia-Reptilia* 27, 409–418.
- Sequeira, F., Sodre, D., Ferrand, N., Bernardi, J.A.R., Sampaio, I., Schneider, H., Vallinoto, M., 2011. Hybridization and massive mtDNA unidirectional introgression between the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* inferred from mtDNA and nuclear markers. *BMC Evol Biol* 11, 264.
- Shaw, T., Ruan, Z., Glenn, T., Liu, L., 2013. STRAW: Species TRee Analysis Web server. *Nucleic Acids Research* 41, W238–241.
- Silvestro, D., Michalak, I., 2010. RAXML GUI: a graphical front-end for RAXML. Available at: <<http://sourceforge.net/projects/raxmlgui/>>.
- Sousa-Neves, T., Aleixo, A., Sequeira, F., 2013. Cryptic patterns of diversification of a widespread Amazonian woodcreeper species complex (Aves: Dendrocolaptidae) inferred from multilocus phylogenetic analysis: implications for historical biogeography and taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68, 410–424.
- Stamatakis, A., 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.
- Stephens, M., Smith, N., Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 978–989.
- Stephens, M., Donnelly, P., 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1162–1169.
- Stöck, M., Dufresnes, C., Litvinchuk, S.N., Lymberakis, P., Biollay, S., Berroneau, M., Borzée, A., Ghali, K., Ogielska, M., Perrin, N., 2012. Cryptic diversity among Western Palearctic tree frogs: postglacial range expansion, range limits, and secondary contacts of three European tree frog lineages (*Hyla arborea* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65, 1–9.
- Tajima, F., 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- van de Vliet, M.S., Beebee, T.J., Diekmann, O.E., 2012. Genetic evidence for a distinct *Pelodytes* lineage in southwest Portugal: implications for the use of pre-developed microsatellite markers. *Conserv. Genet.* 13, 605–611.
- Veith, M., Fromhage, L., Kosuch, J., Vences, M., 2006. Historical biogeography of Western Palearctic pelobatid and pelodytid frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Contributions to Zoology* 75, 109–120.
- Vences, M., Wake, D.B., 2007. Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. In: Heatwhole and Tyler (eds.), *Amphibian Biology*, Vol. 7. Systematics. Surrey Beatty & Sons, Australia, pp. 2613–2671.
- Villesen, P., 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* 7, 965–968.
- Watterson, G.A., 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Pop. Biol.* 7, 256–276.
- Weisrock, D.W., Rasoloarison, R.M., Fiorentino, I., Ralison, J.M., Goodman, S.M., Kappeler, P.M., Yoder, A.D., 2010. Delimiting species without nuclear monophyly in Madagascar's mouse lemurs. *PLoS ONE* 5, e9883.
- Weiss, S., Ferrand, N., 2007. *Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer, Netherlands.
- Wiens, J.J., 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Syst Biol* 56, 875–878.
- Zwickl, D.J., 2006. *Genetic Algorithm Approaches for the Phylogenetic Analysis of Large Biological Sequence Datasets Under the Maximum Likelihood Criterion*. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

Table 1. Sample information: ID_POP as in Fig. 1 (an asterisk marks populations where two different mtDNA clades were found in the same locality), sample code, mtDNA clade, locality, country, latitude and longitude and GenBank accession numbers for newly generated sequences. The “Observations” field highlights instances of cyto-nuclear discordance (based on discordance between gene trees).

ID_P OP	Sample Code	mtDNA	Locality	Country	Latitude	Longitude	<i>cob</i>	<i>nad4</i>	β - <i>fibint7</i>	<i>PPP3CAint4</i>	Observations
1	MIN01	A	Mindelo	Portugal	41,30	-8,71	X	X		X	
	MIN02	A	Mindelo	Portugal	41,30	-8,71	X	X			
2	Torr	-	Murtosa, Portugal	Portugal	40,76	-8,71				X	
3	IMS4630	A	São Jacinto	Portugal	40,67	-8,74	X	X			
	IMS4631	A	São Jacinto	Portugal	40,67	-8,74	X	X			
4	BUS03	A	Bustos, Oliveira do Bairro	Portugal	40,49	-8,61	X	X			
5	Coimbra	A	Coimbra	Portugal	40,21	-8,43	X	X	X	X	
6	Svarao	A	Santo Varão, Montemor-o-Velho	Portugal	40,18	-8,60	X	X			
7	SOU01	A	Soure	Portugal	40,06	-8,63	X	X	X		
	Soure	A	Soure	Portugal	40,06	-8,63	X	X			
8	SAL01	A	Salgueiral, Vila-Velha-de-Ródão	Portugal	39,65	-7,67	X	X	X		
	SAL02	A	Salgueiral, Vila-Velha-de-Ródão	Portugal	39,65	-7,67	X	X	X		
9	IMS4624	A	Rexaldia	Portugal	39,57	-8,53	X	X			
	IMS4639	A	Granja do Ulmeiro, Rio Mondego	Portugal	40,16	-8,64	X	X			
	IMS4640	A	Granja do Ulmeiro, Rio Mondego	Portugal	40,16	-8,64	X	X			
10	IMS4618	A	Mosteiro de Alcanena	Portugal	39,42	-8,84	X	X			
	IMS4619	A	Mosteiro de Alcanena	Portugal	39,42	-8,84	X	X			
11	SAires01	A	Serra de Aires	Portugal	39,56	-8,58	X	X		X	
	SAires02	A	Serra de Aires	Portugal	39,56	-8,58	X	X			
	SAires03	-	Serra de Aires	Portugal	39,56	-8,58			X	X	
12	IMS4614	A	Alpalhão	Portugal	39,27	-7,38	X	X			
	IMS4615	A	Alpalhão	Portugal	39,27	-7,38	X	X			
	IMS4616	A	Alpalhão	Portugal	39,27	-7,38	X	X			
	IMS4617a	A	Alpalhão	Portugal	39,27	-7,38	X	X			
	IMS4617b	A	Alpalhão	Portugal	39,27	-7,38	X	X			
13	IMS2893	-	Montejunto	Portugal	39,17	-9,02			X	X	
	IMS2894	A	Montejunto	Portugal	39,17	-9,02	X	X	X	X	
14	IMS2870	-	Sintra-Mafra	Portugal	38,83	-9,36			X	X	
	IMS2871	-	Sintra-Mafra	Portugal	38,83	-9,36			X		
15	CA15	A	Cacém	Portugal	38,78	-9,31	X	X	X		
16	CID03	B	Cidrão, Mosqueirões, Grândola	Portugal	38,12	-8,56	X	X			
	CID06	B	Cidrão, Mosqueirões, Grândola	Portugal	38,12	-8,56	X	X			
17*	GRA03	B	Grândola	Portugal	38,08	-8,46	X	X			
	GRA04	B	Grândola	Portugal	38,08	-8,46	X	X			
	GRA06	A	Grândola	Portugal	38,08	-8,46	X	X			
	Grando08	A	Grândola	Portugal	38,08	-8,46	X	X	X	X	Cyto-nuclear discordance (β - <i>fibint7</i> and <i>PPP3CAint4</i>)
18*	OLO21	A	Outeiro do Lobo	Portugal	38,01	-8,53	X	X	X	X	Cyto-nuclear discordance (β - <i>fibint7</i> and <i>PPP3CAint4</i>)
	OLO18	B	Outeiro do Lobo	Portugal	38,01	-8,53	X	X			
	OLO20	B	Outeiro do Lobo	Portugal	38,01	-8,53	X	X		X	
	OLO22	-	Outeiro do Lobo	Portugal	38,01	-8,53				X	
19*	XAU01	A	Vale de Água	Portugal	37,92	-8,55	X	X		X	
	XAU02	A	Vale de Água	Portugal	37,92	-8,55	X	X			
	XAU04	B	Vale de Água	Portugal	37,92	-8,55	X	X			
20*	CBS01	A	Campo Redondo	Portugal	37,80	-8,56	X	X			
	CBS02	A	Campo Redondo	Portugal	37,80	-8,56	X	X			
	BICD3	-	Campo Redondo	Portugal	37,80	-8,55				X	
	BICD5	-	Campo Redondo	Portugal	37,80	-8,55				X	
	BICD6	A	Campo Redondo	Portugal	37,80	-8,55	X	X			
	BICD7	A	Campo Redondo	Portugal	37,80	-8,55	X	X			
	BICD8	B	Campo Redondo	Portugal	37,80	-8,55	X	X			
	BICD9	A	Campo Redondo	Portugal	37,80	-8,55	X	X			
	COLF2	A	Campo Redondo	Portugal	37,78	-8,56	X	X			
	COLF3	A	Campo Redondo	Portugal	37,78	-8,56	X	X			

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

	COLF5	A	Campo Redondo	Portugal	37,78	-8,56	X	X			
	COLF4	B	Campo Redondo	Portugal	37,78	-8,56	X	X			
21*	SOL03	A	Soalheira, Campo Redondo	Portugal	37,76	-8,51	X	X		X	Cyto-nuclear discordance (<i>PPP3CAint4</i>) (clades A+B)
	SOL04	A	Soalheira, Campo Redondo	Portugal	37,76	-8,51	X	X			
	SOL01	B	Soalheira, Campo Redondo	Portugal	37,76	-8,51	X	X			
22	VMF49	A	Vila Nova de Milfontes	Portugal	37,74	-8,74	X	X			
23	SLU40	A	Vila Nova de Milfontes	Portugal	37,72	-8,71	X	X			
	SLU01	A	Vila Nova de Milfontes	Portugal	37,72	-8,71	X	X			
	SLU02	A	Vila Nova de Milfontes	Portugal	37,72	-8,71	X	X			
	SLU06	-	Vila Nova de Milfontes	Portugal	37,72	-8,71				X	
	VMF01	A	Vila Nova de Milfontes	Portugal	37,72	-8,77	X	X			
	VMF02	A	Vila Nova de Milfontes	Portugal	37,72	-8,77	X	X			
	VMF03	A	Vila Nova de Milfontes	Portugal	37,72	-8,77	X	X			
24	ALM25b	A	Cavaleiros	Portugal	37,67	-8,79	X	X			
	CVL01	A	Cavaleiros	Portugal	37,64	-8,76	X	X			
	CVL03	A	Cavaleiros	Portugal	37,64	-8,76	X	X			
25	BMP01	A	Bemposta	Portugal	37,60	-8,61	X	X			
	BMP03	A	Bemposta	Portugal	37,60	-8,61	X	X			
	BMP05	A	Bemposta	Portugal	37,60	-8,61	X	X			
26	PAC401	A	Odeceixe	Portugal	37,43	-8,78	X	X			
	PAC402	A	Odeceixe	Portugal	37,43	-8,78	X	X			
	PAC403	A	Odeceixe	Portugal	37,43	-8,78	X	X			
27	BRR01	A	Barreiros, Boiã	Portugal	37,39	-8,31	X	X			
	BRR03	A	Barreiros, Boiã	Portugal	37,39	-8,31	X	X			
28	ALJ01	-	Aljezur	Portugal	37,30	-8,84				X	
	ALJ02	A	Aljezur	Portugal	37,30	-8,84	X	X		X	
	ALJ03	A	Aljezur	Portugal	37,30	-8,84	X	X			
	TEL07	A	Vale de Telha	Portugal	37,30	-8,84	X	X			
	TEL08	A	Vale de Telha	Portugal	37,30	-8,84	X	X			
	LAG312	A	Aljezur	Portugal	37,31	-8,81	X	X			
	LAG313	A	Aljezur	Portugal	37,31	-8,81	X	X			
29	PEN31	A	Penina	Portugal	37,25	-8,11	X	X			
	PEN32	A	Penina	Portugal	37,25	-8,11	X	X			
	RDP03	A	Rocha de Pena	Portugal	37,25	-8,10	X	X	X		
	RDP04	A	Rocha de Pena	Portugal	37,25	-8,10	X	X			
30	NDB40	A	Nave do Barão	Portugal	37,22	-8,05	X	X			
	NDB41	A	Nave do Barão	Portugal	37,22	-8,05	X	X			
31	PFU212	A	Pena Furada	Portugal	37,15	-8,91	X	X			
	PFU213	A	Pena Furada	Portugal	37,15	-8,91	X	X			
32	VDB47	A	Vila do Bispo	Portugal	37,10	-8,88	X	X			
	ROR91	A	Vila do Bispo	Portugal	37,11	-8,91	X	X			
	ROR92	A	Vila do Bispo	Portugal	37,11	-8,91	X	X			
	ROR93	A	Vila do Bispo	Portugal	37,11	-8,91	X	X			
33	Lagos	A	Lagos	Portugal	37,12	-8,65	X	X	X	X	
34	AEL23	B	Aldeia dos Elvas, Aljustrel	Portugal	37,81	-8,28	X	X			
	AEL24	B	Aldeia dos Elvas, Aljustrel	Portugal	37,81	-8,28	X	X			
35	CAH05	B	Canhestros	Portugal	38,04	-8,27	X	X			
36	OUR09	B	Ourique	Portugal	37,72	-8,30	X	X			
	OUR16	B	Ourique	Portugal	37,67	-8,26	X	X			
	OUR18	B	Ourique	Portugal	37,67	-8,26	X	X			
37	RMO32	B	Rio de Moinhos, Aljustrel	Portugal	37,89	-8,19	X	X	X	X	
	RMO33	B	Rio de Moinhos, Aljustrel	Portugal	37,89	-8,19	X	X			
38	ESC01	B	Santiago do Escoural	Portugal	38,54	-8,17	X	X			
	ESC02	B	Santiago do Escoural	Portugal	38,54	-8,17	X	X	X		
39	CAV01	B	Castro Verde	Portugal	37,74	-8,01	X	X			
	CAV77	B	Castro Verde	Portugal	37,74	-8,01	X	X			
	CAV78	B	Castro Verde	Portugal	37,74	-8,01	X	X			
40	ARU16	B	Alcaira Ruiva, Mértola	Portugal	37,71	-7,79	X	X			
	ARU17	B	Alcaira Ruiva, Mértola	Portugal	37,71	-7,79	X	X			
41	RMT1	B	Monte do Trigo	Portugal	38,40	-7,73	X	X			
42	ME02	B	Mértola	Portugal	37,64	-7,57	X	X			
43	IMS2881	B	Sedas	Portugal	37,54	-7,60	X	X	X	X	
	IMS2882	B	Sedas	Portugal	37,54	-7,60	X	X	X	X	
44	ODE2023	B	Odeleite	Portugal	37,34	-7,49	X	X	X	X	
	ALO02	B	Almada de Ouro	Portugal	37,34	-7,49	X	X	X	X	
45	PAY2032	B	Paymogo	Spain	37,75	-7,33	X	X	X		
46	GLB01	B	Los Barros	Spain	39,13	-7,06	X	X		X	

EVIDENCIA MOLECULAR DE ESPECIES CANDIDATAS CRÍPTICAS EN LOS PELODYTES IBÉRICOS

	GLB02	B	Los Barros	Spain	39,13	-7,06	X	X		
	GLB03	B	Los Barros	Spain	39,13	-7,06	X	X		
47	NSE02	B	Ouguela	Portugal	39,08	-7,03	X	X		
48	SMB02	B	Santa Marta de Barros	Spain	38,60	-6,61	X	X		
49	ZFR01	B	Zafra	Spain	38,40	-6,44	X	X		
	ZFR02	B	Zafra	Spain	38,40	-6,44	X	X		
50	EBD55	B	Parque Nacional de Doñana	Spain	37,00	-6,44	X	X	X	
51	CJA04	B	Campo de Javata, Cala	Spain	37,96	-6,32	X	X		
	CJA03	B	Campo de Javata, Cala	Spain	37,96	-6,32	X	X		
52	IB32	B	PN Doñana	Spain	37,07	-6,28	X	X	X	X
	IB35	B	PN Doñana	Spain	37,07	-6,28	X	X	X	X
	IBH1	B	PN Doñana	Spain	37,07	-6,28	X	X	X	
	IBH2	B	PN Doñana	Spain	37,07	-6,28	X	X	X	X
	IBL4	B	PN Doñana	Spain	37,07	-6,28	X	X	X	X
	IBL5	B	PN Doñana	Spain	37,07	-6,28	X	X	X	
53	AZN157	-	Aznalcollar	Spain	37,52	-6,28				X
54	CQU01	B	Casa Quemada, Sanlucar la Mayor	Spain	37,40	-6,24	X	X		
55	TRE185	B	Salida A-471. Trebujena	Spain	36,84	-6,20	X	X		
	TRE02	B	Salida A-471. Trebujena	Spain	36,86	-6,19	X	X		
	TRE13	B	Salida A-471. Trebujena	Spain	36,86	-6,19	X	X		
	TRE14	B	Salida A-471. Trebujena	Spain	36,86	-6,19	X	X		
56	JER01	B	Jerez	Spain	36,66	-6,17	X	X		
	JER02	B	Jerez	Spain	36,66	-6,17	X	X		
	JER12	B	Jerez	Spain	36,66	-6,17	X	X	X	X
57	ATA01	B	Montellano	Spain	36,95	-5,81	X	X		X
	ATA02	B	Montellano	Spain	36,95	-5,81	X	X		
58	POJ27	B	Pista Ojén	Spain	36,15	-5,59	X	X		
59	IMS2868	B	Marchena-Puebla de Cazalla	Spain	37,28	-5,37	X	X	X	X
	IMS2869	B	Marchena-Puebla de Cazalla	Spain	37,28	-5,37	X	X	X	X
60	GRZ02	B	Grazalema	Spain	36,74	-5,34	X	X		
	GRZ04	B	Grazalema	Spain	36,74	-5,34	X	X		
	GRZ10	B	Grazalema	Spain	36,74	-5,34	X	X		
61	IMS2880	B	Puebla de Cazalla	Spain	37,17	-5,24	X	X	X	
62	OLV73	B	Olvera	Spain	36,95	-5,19	X	X		
63	RON23	B	Ronda	Spain	36,77	-5,08	X	X		
64	GUA41	B	Guadalcazar	Spain	37,76	-4,95	X	X		
65	TOB09	B	Toba	Spain	37,99	-4,90	X	X	X	
	TOB10	B	Toba	Spain	37,99	-4,90	X	X	X	
66	IMS4425	B	Estación de Obejo	Spain	38,03	-4,80	X	X		
	IMS4426	B	Estación de Obejo	Spain	38,03	-4,80	X	X		
67	TAR67	B	Taraje	Spain	37,32	-4,59	X	X	X	X
68	IMS2863	-	Cabra	Spain	37,49	-4,38			X	
69	PAR101	B	Nac. Parrica	Spain	36,99	-4,16	X	X		
	PAR102	B	Nac. Parrica	Spain	36,99	-4,16	X	X		
	ZAF103	B	Zafarraya	Spain	36,99	-4,16	X	X		
	ZAF104	B	Zafarraya	Spain	36,99	-4,16	X	X		
	ZAF33	-	Zafarraya	Spain	36,99	-4,16				X
	ZAF82	-	Zafarraya	Spain	36,99	-4,16			X	X
70	VIL163	B	Vilches	Spain	38,14	-3,54	X	X		
	VIL164	B	Vilches	Spain	38,14	-3,54	X	X		
	VIL182	-	Vilches	Spain	38,14	-3,54				X
71	ARQ01	B	Arquillos	Spain	38,15	-3,46	X	X		
	ARQ02	B	Arquillos	Spain	38,15	-3,46	X	X		
72	JAE47	B	Úbeda	Spain	38,02	-3,41	X	X		
	51UBD	B	Úbeda	Spain	38,02	-3,39	X	X		
73	SAN45	B	Santisteban del Puerto	Spain	38,22	-3,28	X	X		
	SAN46	B	Santisteban del Puerto	Spain	38,22	-3,28	X	X		
	SAN49	B	Santisteban del Puerto	Spain	38,22	-3,28	X	X		
74	MON35	B	Montizón	Spain	38,38	-3,04	X	X		
	MON36	B	Montizón	Spain	38,38	-3,04	X	X		
75*	ISN1	B	Iznatoraf	Spain	38,15	-3,03	X	X	X	X
	IZN228	B	Iznatoraf	Spain	38,15	-3,03	X	X		
	IZN222	C	Iznatoraf	Spain	38,15	-3,03	X	X		
	IZN01	B	Iznatoraf	Spain	38,15	-3,03	X	X		
76	BEAD11	B	Arroyo de Beas de Segura	Spain	38,28	-2,95	X	X		
	BEAD12	B	Arroyo de Beas de Segura	Spain	38,28	-2,95	X	X		
77	35BED01	C	Bedar	Spain	37,20	-1,99	X	X	X	X
	35BED02	C	Bedar	Spain	37,20	-1,99	X	X		
78	AGU04	C	Águilas	Spain	37,56	-1,87	X	X		

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

	AGU05	C	Águilas	Spain	37,56	-1,87	X	X			
79	49LORC	C	Pozo en Rambla de las Fuentes, Lorca	Spain	37,76	-1,98	X	X	X	X	
80	ANI3059	-	Salida de las Ánimas	Spain	37,90	-2,64			X		
81	CAP3047	C	Cortijo El Capricho	Spain	37,95	-2,43	X	X	X		
82	CUE15	C	Cueva Paría	Spain	37,97	-2,76	X	X			
83	FBell	C	Fuente Bella	Spain	38,04	-2,46	X	X	X		
	FBell03	C	Fuente Bella	Spain	38,04	-2,46	X	X			
	FBell04	C	Fuente Bella	Spain	38,04	-2,46	X	X	X	X	
	POR3050	C	Salida Porcunas	Spain	38,00	-2,46	X	X	X		
84	ACDC01	C	Casas de Carrasco, Santiago de la Espada	Spain	38,12	-2,69	X	X			
	ACDC02	C	Casas de Carrasco, Santiago de la Espada	Spain	38,12	-2,69	X	X			
	CDC7324	C	Casas de Carrasco, Santiago de la Espada	Spain	38,13	-2,69	X	X			
85	IMS1958	C	Aspe	Spain	38,33	-0,73	X	X	X	X	
86	54ANCH	C	CM 412 Km 230, bajo la Anchura	Spain	38,45	-2,09	X	X			
87	VRO03	C	Villarodrigo	Spain	38,50	-2,71	X	X		X	
	VRO04	C	Villarodrigo	Spain	38,50	-2,71	X	X			
	VRO06	-	Villarodrigo	Spain	38,50	-2,71				X	
	VRO07	-	Villarodrigo	Spain	38,50	-2,71				X	
	VRO08	-	Villarodrigo	Spain	38,50	-2,71				X	
	VRO09	-	Villarodrigo	Spain	38,50	-2,71				X	
	VRT10	C	Laguna del Tiro. Villarodrigo	Spain	38,49	-2,70	X	X			
	VRT11	C	Laguna del Tiro. Villarodrigo	Spain	38,49	-2,70	X	X			
88*	Mest01	B	Mestanza	Spain	38,60	-4,02	X	X		X	Cyto-nuclear discordance (<i>PPP3CAint4</i>) (clades B+C)
	Mest02	C	Mestanza	Spain	38,60	-4,02	X	X	X	X	
	MES01	C	Mestanza	Spain	38,60	-4,02	X	X			
	MES02	C	Mestanza	Spain	38,60	-4,02	X	X			
	MES06	C	Mestanza	Spain	38,60	-4,02	X	X		X	
	MES07	-	Mestanza	Spain	38,60	-4,02				X	<i>PPP3CAint4</i> alleles clustering with clades B and C
89	CAD31	C	Torre de Juan Abad	Spain	38,60	-3,10	X	X			
	CAD32	C	Torre de Juan Abad	Spain	38,60	-3,10	X	X			
90	REO01	C	Reolid	Spain	38,62	-2,58	X	X			
91	CAL41	C	Campo de Calatrava	Spain	38,66	-3,84	X	X			
	CAL42	C	Campo de Calatrava	Spain	38,66	-3,84	X	X			
92	ALC27	C	Río Alcaraz, Albacete	Spain	38,66	-2,54	X	X			
	ALC28	C	Río Alcaraz, Albacete	Spain	38,66	-2,54	X	X			
	ALC29	C	Río Alcaraz, Albacete	Spain	38,66	-2,54	X	X			
93	IMS1941	C	Mas de Celedons	Spain	38,67	-0,52	X	X	X	X	
	IMS1942	C	Mas de Celedons	Spain	38,67	-0,52	X	X	X	X	
94	CANa90	C	Cañamares	Spain	38,74	-2,76	X	X			
	CANa91	C	Cañamares	Spain	38,74	-2,76	X	X			
	CANa92	C	Cañamares	Spain	38,74	-2,76	X	X			
	CANa93	C	Cañamares	Spain	38,74	-2,76	X	X			
	SMA06	C	Santa María	Spain	38,73	-2,74	X	X	X	X	
	SMA94	C	Santa María	Spain	38,73	-2,74	X	X			
	SMA95	C	Santa María	Spain	38,73	-2,74	X	X			
95	TIR01	C	Tirteafuera	Spain	38,74	-4,05	X	X		X	
	TIR02	C	Tirteafuera	Spain	38,74	-4,05	X	X			
	TIR03	C	Tirteafuera	Spain	38,74	-4,05	X	X			
	TIR04	C	Tirteafuera	Spain	38,74	-4,05	X	X			
96	VVE01	C	Villaverde	Spain	38,81	-2,37	X	X			
97	55LOS	C	Canal de Los Losares	Spain	38,82	-1,09	X	X	X	X	
98	56BON	C	Pozo cerca Cerro del Almarejo	Spain	38,85	-1,34	X	X	X		
99	BON70	C	El Bonillo, Loma de Pelao	Spain	38,92	-2,60	X	X		X	
	BON71	C	El Bonillo, Loma de Pelao	Spain	38,92	-2,60	X	X			
	BON72	C	El Bonillo, Loma de Pelao	Spain	38,92	-2,60	X	X			
	57AYHOR	-	Arroyo de Los Horcajos	Spain	38,93	-2,58			X	X	
100	RUI62	C	Laguna Tinaja. Ruidera	Spain	38,93	-2,83	X	X			
	RUI63	C	Laguna Tinaja. Ruidera	Spain	38,93	-2,83	X	X			
	RUI64	C	Laguna Tinaja. Ruidera	Spain	38,93	-2,83	X	X			
	RUI65	C	Laguna Tinaja. Ruidera	Spain	38,93	-2,83	X	X			
101	IMS1881	C	Enguera	Spain	38,94	-0,79	X	X			

EVIDENCIA MOLECULAR DE ESPECIES CANDIDATAS CRÍPTICAS EN LOS PELODYTES IBÉRICOS

	IMS1882	C	Enguera	Spain	38,94	-0,79	X	X	X	X	
	IMS1889	C	Enguera	Spain	38,94	-0,79	X	X			X
	IMS1890	C	Enguera	Spain	38,94	-0,79	X	X			X
	IMS1891	C	Enguera	Spain	38,94	-0,79	X	X			X
	IMS1892	C	Enguera	Spain	38,94	-0,79	X	X			X
	IMS1893	C	Enguera	Spain	38,94	-0,79	X	X			X
102	BON77	C	El Bonillo, Navazo de Navalcudia	Spain	38,94	-2,49	X	X			
	BON78	C	El Bonillo, Navazo de Navalcudia	Spain	38,94	-2,49	X	X			
	58PIC	-	Cañada de Picado o Losilla	Spain	38,90	-2,51			X	X	
103	HIG84	C	Higueruela	Spain	38,97	-1,43	X	X			
	HIG85	C	Higueruela	Spain	38,97	-1,43	X	X			
104	OMO58	C	Ossa de Montiel	Spain	39,00	-2,69	X	X			
	LEZ23	C	Lezuza	Spain	39,02	-2,38	X	X			
	LEZ24	C	Lezuza	Spain	39,02	-2,38	X	X			
105	LEZ15	C	Lezuza	Spain	39,03	-2,32	X	X			
	LEZ16	C	Lezuza	Spain	39,03	-2,32	X	X			
106	PDR05	C	Puebla de Don Rodrigo	Spain	39,08	-4,61	X	X			
107	DAI60	C	Parque Nacional Tablas de Daimiel	Spain	39,14	-3,69	X	X			
	DAI61	C	Parque Nacional Tablas de Daimiel	Spain	39,14	-3,69	X	X			
	IMS1558	C	Malagón	Spain	39,18	-3,91	X	X	X	X	
	IMS1559	C	Malagón	Spain	39,18	-3,91	X	X	X	X	
108	MAL01	C	Malagón	Spain	39,18	-3,91	X	X	X	X	
	MAL02	C	Malagón	Spain	39,18	-3,91	X	X			
109	IMS1578	C	Las Labores	Spain	39,29	-3,49	X	X	X	X	
	IMS1579	C	Las Labores	Spain	39,29	-3,49	X	X	X	X	
110	IMS1587	C	Pueblonuevo de Bullaque	Spain	39,31	-4,26	X	X	X	X	
	IMS1588	C	Pueblonuevo de Bullaque	Spain	39,31	-4,26	X	X	X	X	
	CAB01	C	Parque Nacional de Cabañeros	Spain	39,29	-4,33	X	X			
	CAB02	C	Parque Nacional de Cabañeros	Spain	39,29	-4,33	X	X			
111	IMS1538	C	Herencia	Spain	39,38	-3,30	X	X	X	X	
	IMS1539	C	Herencia	Spain	39,38	-3,30	X	X	X	X	
112	IMS1659	C	Urda	Spain	39,45	-3,81	X	X	X	X	
	IMS1660	C	Urda	Spain	39,45	-3,81	X	X	X	X	
113	IMS1533	C	El Toboso	Spain	39,49	-2,98	X	X	X	X	
	IMS1534	C	El Toboso	Spain	39,49	-2,98	X	X			
114	IMS1618	C	Marjaliza	Spain	39,51	-4,11	X	X			
	IMS1619	C	Marjaliza	Spain	39,51	-4,11	X	X			
	IMS1640	C	Marjaliza	Spain	39,52	-4,07	X	X	X	X	
	IMS1641	C	Marjaliza	Spain	39,52	-4,07	X	X	X		
115	IMS1976	C	Las Nogueras	Spain	39,59	-1,09	X	X	X	X	
	IMS1977	C	Las Nogueras	Spain	39,59	-1,09	X	X	X	X	
116	IMS1513	C	Villacañas	Spain	39,63	-3,36	X	X	X	X	
	IMS1514	C	Villacañas	Spain	39,63	-3,36	X	X	X	X	
117	IMS2786	C	Navahermosa	Spain	39,66	-4,42	X	X	X	X	
	IMS2787	C	Navahermosa	Spain	39,66	-4,42	X	X	X	X	
118	IMS2051	C	Alcublas	Spain	39,83	-0,66	X	X	X	X	
	IMS2052	C	Alcublas	Spain	39,83	-0,66	X	X	X	X	
119	PHS3	C	Cerro Pelado	Spain	39,86	-4,09	X	X	X		
	PHS4	C	Cerro Pelado	Spain	39,86	-4,09	X	X	X	X	
120	LTO02	C	La Toba	Spain	39,94	-1,70	X	X	X		
121	IMS3158	C	Camino del Sumidero, Los Palancares	Spain	40,02	-1,98	X	X	X	X	
	IMS3159	C	Camino del Sumidero, Los Palancares	Spain	40,02	-1,98	X	X	X	X	
122	IMS1751	C	Soto de Oreja, Ontígola	Spain	40,04	-3,51	X	X	X		
	IMS1752	C	Soto de Oreja, Ontígola	Spain	40,04	-3,51	X	X	X		
123	PP300	C	Valdepuercos	Spain	40,06	-3,30	X	X	X	X	
	PP301	C	Valdepuercos	Spain	40,06	-3,30	X	X	X	X	
124	PP01	C	Altos de Palomero, Ciempozuelos	Spain	40,13	-3,62	X	X			
125	IMS1756	C	Castillejos, Fuentidueña	Spain	40,14	-3,14	X	X	X	X	
	IMS1757	C	Castillejos, Fuentidueña	Spain	40,14	-3,14	X	X	X	X	
	IMS1781	C	Estremera	Spain	40,15	-3,12	X	X	X	X	
	IMS1782	C	Estremera	Spain	40,15	-3,12	X	X			
126	PP278	C	Valdemoro	Spain	40,18	-3,66	X	X	X	X	
	PP279	C	Valdemoro	Spain	40,18	-3,66	X	X	X	X	
127	PP142	C	Morata de Tajuña	Spain	40,24	-3,43	X	X	X	X	
	PP143	C	Morata de Tajuña	Spain	40,24	-3,43	X	X	X	X	
128	PP21	C	La Boyeriza, camino de	Spain	40,26	-3,56	X	X	X	X	

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS (Pelodytes spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

			Polvorines									
	PP22	C	La Boyeriza, camino de Polvorines	Spain	40,26	-3,56	X	X	X			
129	PP42	C	Carabaña	Spain	40,27	-3,25	X	X	X	X		
	PP43	C	Carabaña	Spain	40,27	-3,25	X	X	X	X		
130	IMS1511	C	Camino de Preresas (La Aldehuela) Getafe	Spain	40,30	-3,60	X	X	X	X		
	IMS1512	C	Camino de Preresas (La Aldehuela) Getafe	Spain	40,30	-3,60	X	X	X	X		
131	PP166	C	Arroyo de la Vega	Spain	40,32	-3,20	X	X	X			
	PP167	C	Arroyo de la Vega	Spain	40,32	-3,20	X	X	X			
132	PP102	C	Pozuelo del Rey	Spain	40,37	-3,32	X	X	X	X		
	PP103	C	Pozuelo del Rey	Spain	40,37	-3,32	X	X	X	X		
133	PP248	C	Pezuela del Rey	Spain	40,37	-3,18	X	X	X			
	PP249	C	Pezuela del Rey	Spain	40,37	-3,18	X	X	X	X		
134	PP62	C	La Yesera, Rivas Vaciamadrid	Spain	40,39	-3,52	X	X	X	X		
	PP63	C	La Yesera, Rivas Vaciamadrid	Spain	40,39	-3,52	X	X	X	X		
	PP82	C	La Guindalera, San Fernando de Henares	Spain	40,41	-3,50	X	X	X			
	PP83	C	La Guindalera, San Fernando de Henares	Spain	40,41	-3,50	X	X	X	X		
135	PP228	C	Las Cruces, Pezuela del Rey	Spain	40,42	-3,17	X	X	X	X		
	PP229	C	Las Cruces, Pezuela del Rey	Spain	40,42	-3,17	X	X	X	X		
136	IMS2116	C	Cedrillas	Spain	40,46	-0,86	X	X	X	X		
	IMS2117	-	Cedrillas	Spain	40,46	-0,86			X	X		
137	IMS2081	C	Ares del Maestre	Spain	40,46	-0,17	X	X				
	IMS2082	C	Ares del Maestre	Spain	40,46	-0,17	X	X	X	X		
138	PP122	C	Santorcaz a Los Santos de la Humosa	Spain	40,48	-3,24	X	X	X	X		
	PP123	C	Santorcaz a Los Santos de la Humosa	Spain	40,48	-3,24	X	X	X	X		
139	IMS3203	C	Revilla de Campos	Spain	42,01	-4,71	X	X	X	X		
	IMS3204	C	Revilla de Campos	Spain	42,01	-4,71	X	X	X	X		
140	IMS3918	C	Loma de los Perdigones	Spain	42,11	-1,39	X	X	X			
	IMS3919	C	Loma de los Perdigones	Spain	42,11	-1,39	X	X	X			
141	IMS3876	C	Arnedo, La Maja	Spain	42,29	-2,04	X	X	X			
	IMS3877	C	Arnedo, La Maja	Spain	42,29	-2,04	X	X	X			
142	BUR02	C	Páramo de Masa	Spain	42,66	-3,78	X	X	X	X		
143	Barna01	D	Castellet i la Gornal	Spain	41,25	1,59	X	X	X	X		Cyto-nuclear discordance (β - <i>fibint7</i>)
	Barna02	D	Castellet i la Gornal	Spain	41,25	1,59	X	X		X		Cyto-nuclear discordance (<i>PPP3CAint4</i>) (clades C+D)
144	GAR03	D	El Garraf	Spain	41,27	1,84	X	X				
	GAR01	D	El Garraf	Spain	41,27	1,84	X	X	X	X		Cyto-nuclear discordance (<i>PPP3CAint4</i>) (clades C+D)
	GAR02	D	El Garraf	Spain	41,27	1,84	X	X	X	X		
145	IMS2498	D	Prades	Spain	41,80	1,58	X	X	X	X		
	IMS2499	D	Prades	Spain	41,80	1,58	X	X		X		
146	BRU128	D	El Brull (Osona)	Spain	41,80	2,26	X	X	X	X		
	BRU06	D	El Brull (Osona)	Spain	41,80	2,26	X	X	X	X		
	BRU08	D	El Brull (Osona)	Spain	41,80	2,26	X	X				
147	RIV01	D	Riudarenes	Spain	41,83	2,72	X	X		X		
	RIV02	D	Riudarenes	Spain	41,83	2,72	X	X		X		
148	IMS2477	D	Suria	Spain	41,85	1,79	X	X	X			
	IMS2478	D	Suria	Spain	41,85	1,79	X	X	X	X		
149	SOS04	D	Solsona	Spain	42,10	1,65	X	X				
	SOS05	D	Solsona	Spain	42,10	1,65	X	X	X	X		
	SOS06	D	Solsona	Spain	42,10	1,65	X	X				X
150	LLA01	D	Llança	Spain	42,37	3,16	X	X	X	X		Cyto-nuclear discordance (β - <i>fibint7</i>) (clades C+D)
	LLA02	D	Llança	Spain	42,37	3,16	X	X				
151	Pataris	D	Mare de Pataris	France	43,57	3,70	X	X	X	X		
	Devois	D	Mare de Devois	France	43,57	3,69	X	X	X	X		
152	SUE2310	D	Mare du Mas de Sueuilles	France	43,57	3,70	X	X				

	CAZ1920	D	Cazevieille	France	43,57	3,69	X	X		X
153	MLT10271	D	St. Martin de Castries	France	43,78	3,47	X	X		X
154	SML1808	D	La Boissière	France	43,83	3,75	X	X		
	MSE2150	D	Mare de St-Etienne	France	43,81	3,78	X	X		
155	SMTI0280	D	Saint-Michel	France	43,85	3,39	X	X		X
156	SAV02	D	Savona	Italy	44,18	8,37	X	X		
	SAV04	D	Savona	Italy	44,18	8,37	X	X		
	SAV06	D	Savona	Italy	44,18	8,37	X	X		
157	SBC01	D	Saint-Bonnet-en-Champsaur	France	44,68	6,08	X	X		X
	SBC02	D	Saint-Bonnet-en-Champsaur	France	44,68	6,08	X	X		
158	IMS4024	D	Libourne	France	44,91	-0,27	X	X	X	
	IMS4026	D	Libourne	France	44,91	-0,27	X	X	X	
159	HAV01	D	Estuaire de la Seine	France	49,46	0,21	X	X		
160	AMB01	D	Ambleteuse	France	50,80	1,62	X	X	X	X
	AMB03	D	Ambleteuse	France	50,80	1,62	X	X		
	AMB04	D	Ambleteuse	France	50,80	1,62	X	X		
161	Cauc01		Rize	Turkey			X	X		
	Cauc02		Rize	Turkey			X	X		
162	IMS4649		Uzungol	Turkey			X	X		
	IMS4650		Uzungol	Turkey			X	X		
	IMS4651		Uzungol	Turkey			X	X		
	IMS4652		Uzungol	Turkey			X	X		
	IMS4653		Uzungol	Turkey			X	X		

Table 2. Polymorphism statistics for the mitochondrial and nuclear markers analyzed in this study. (n) number of sequences; (h) number of haplotypes; (S) number of segregating sites; (Hd) haplotype diversity; (π) nucleotide diversity; (θ_w) Watterson's (1975) mutation parameter Theta. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

Marker	n	h	S	Hd	Π	θ_w	Tajima's D	Fu's Fs	R ²
<i>mtDNA</i>									
All	360	151	219	0.962 ± 0.005	0.02780 ± 0.00053	0.02270 ± 0.00466	0.44539	-27.587*	0.0940
Clade A	77	42	54	0.950 ± 0.016	0.00372 ± 0.00022	0.00736 ± 0.00209	-1.65515	-29.493**	0.0473*
Clade B	94	34	41	0.792 ± 0.043	0.00123 ± 0.00015	0.00537 ± 0.00153	-2.45213**	-38.589**	0.0244**
Clade C	151	55	67	0.881 ± 0.024	0.00154 ± 0.00012	0.00803 ± 0.00203	-2.51337***	-74.408***	0.0178**
Clade D	38	20	35	0.940 ± 0.021	0.00640 ± 0.00061	0.00558 ± 0.00185	0.40513	-2.345	0.1298
<i>β-fibint7</i>	278	40	45	0.869 ± 0.014	0.00940 ± 0.00040	0.00965 ± 0.00144	-0.19297	-5.910	0.0783
<i>PPP3CAint4</i>	278	23	25	0.709 ± 0.027	0.00745 ± 0.00039	0.01026 ± 0.00289	-0.88614	-5.044	0.0577

Table 3. Average number of pairwise sequence differences (p-uncorrected distance) within (on the diagonal) and between the four major mtDNA clades in *Pelodytes*. The outgroup *P. caucasicus* is included for reference.

Clade	A	B	C	D	<i>P. caucasicus</i>
A	0.0037				
B	0.0445	0.0012			
C	0.0334	0.0408	0.0015		
D	0.0377	0.0444	0.0348	0.0064	
<i>P. caucasicus</i>	0.1574	0.1625	0.1683	0.1618	0.002

Table 4. SpedeSTEM results (multiple AIC calculations, similar results are recovered with the single AIC calculation, data not shown). K=number of clades; -lnL=negative logarithm of the likelihood function; AIC: Akaike information criterion; delta: difference in AIC score.

k	-lnL	AIC	delta
2	-28537.5314	57079.0628	1983.0597
3	-28547.5068	57101.0135	2005.0105

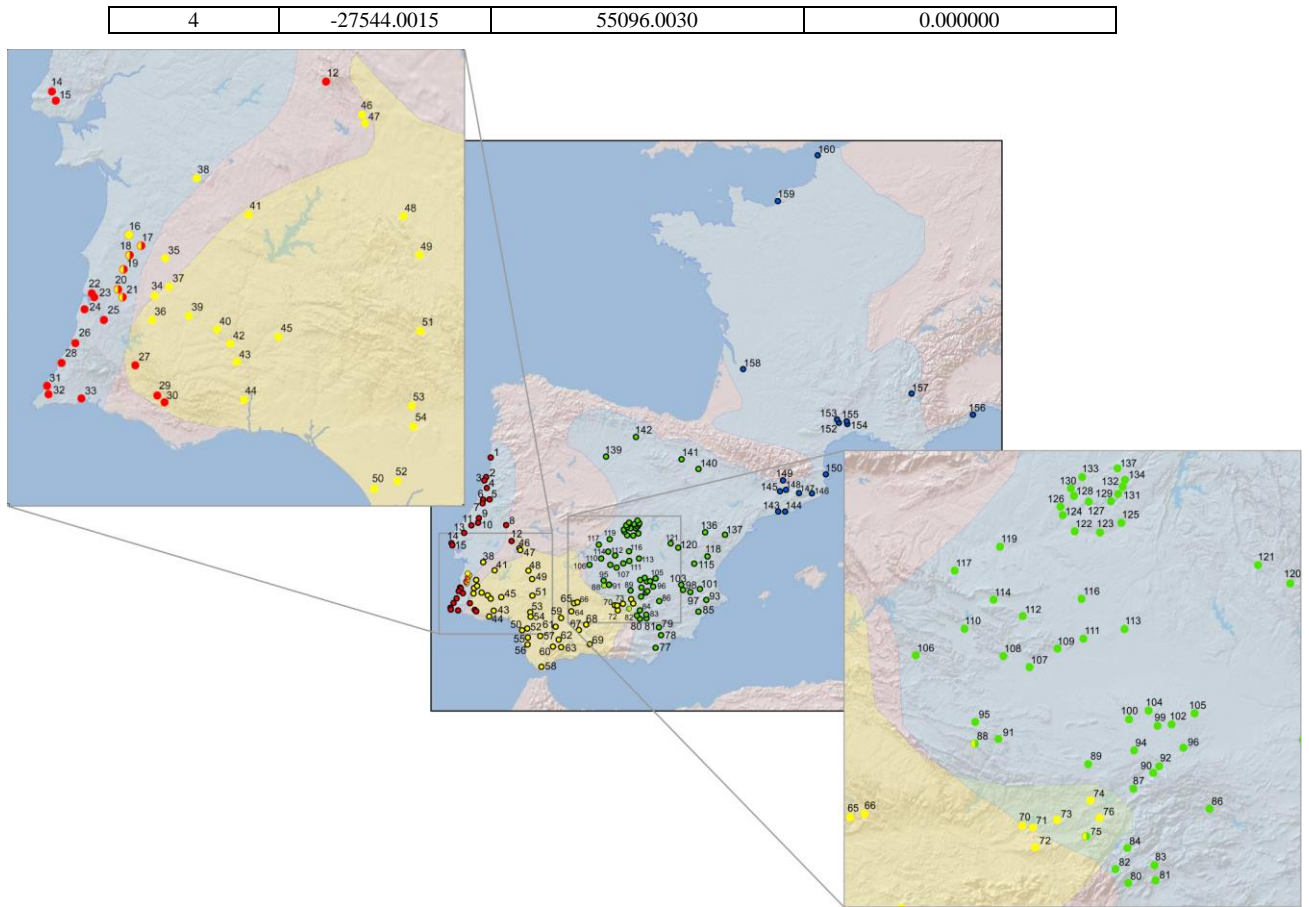


Fig. 1. Location of the 160 populations of *Pelodytes* sampled. Red- clade A; yellow- clade B (*P. ibericus*); green- clade C; and blue- clade D. The different background colors represent IUCN ranges for *P. punctatus* (blue) and *P. ibericus* (yellow). Insets show details of putative secondary contact zones.

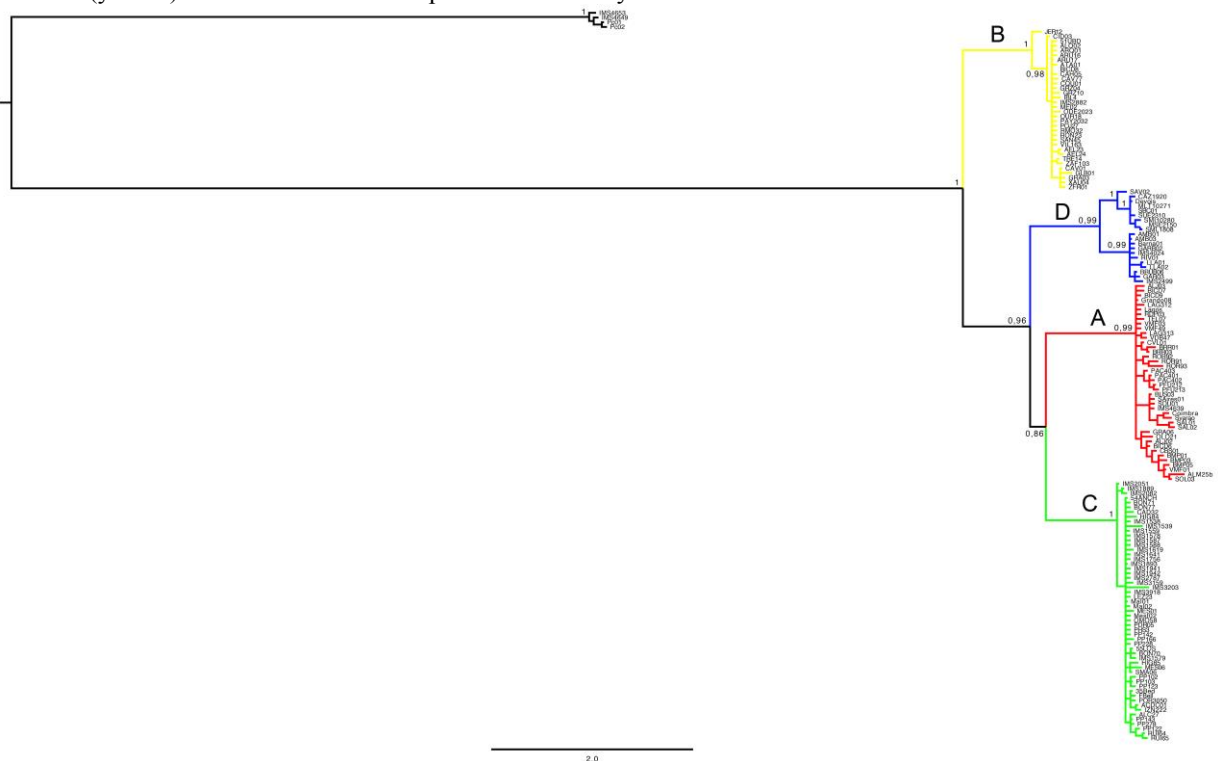


Fig. 2. Bayesian tree showing relationships between haplotypes in the combined mtDNA dataset. Colors as in Fig. 1. Values next to nodes are Bayesian posterior probabilities (BPP).

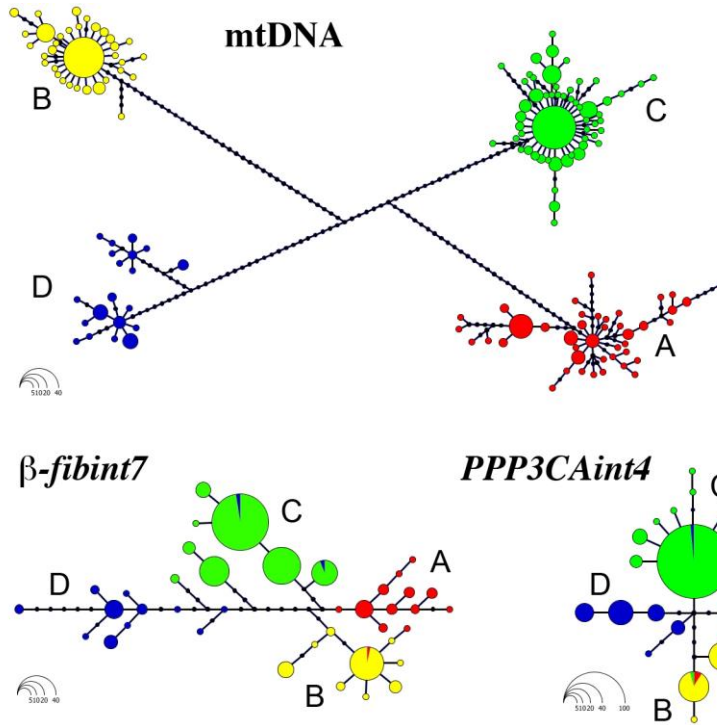


Fig. 3. Haplotype genealogy from Maximum likelihood analysis of mtDNA, β -fibint7 and PPP3CAint3 performed in the software Haploviewer. Colors represent the different mtDNA clades (labeled A-D as in Figs. 1 and 2, see text for details). Each circle represents a different haplotype and its size is proportional to its relative frequency. Dots represent inferred unsampled or extinct haplotype

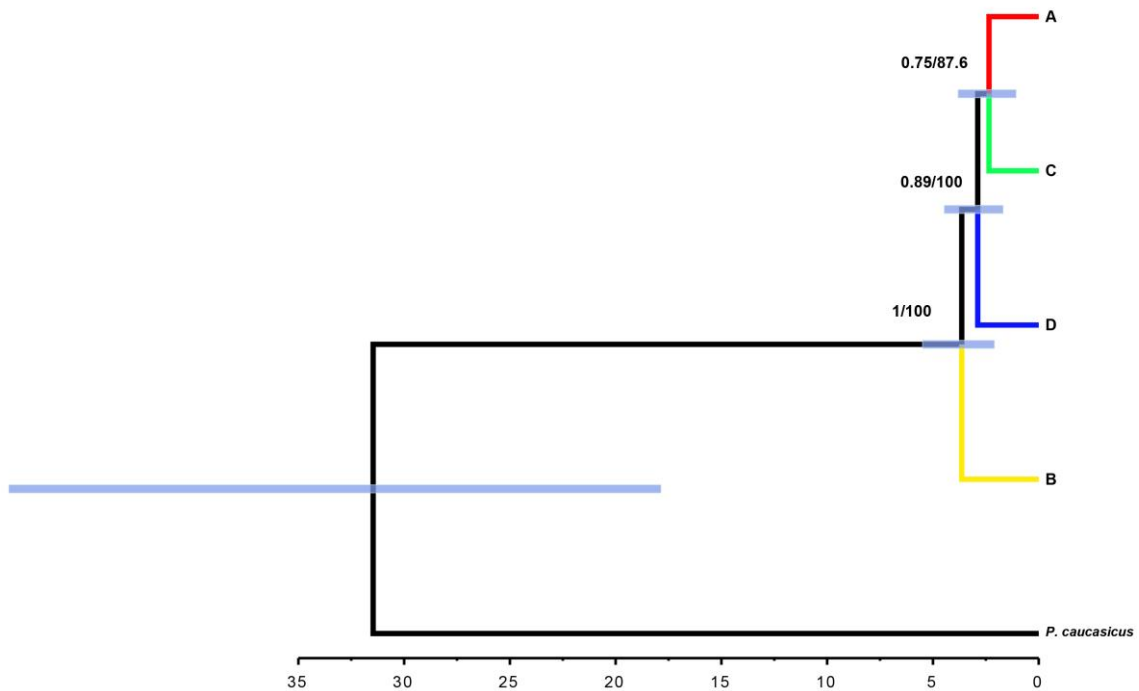


Fig. 4. Species tree of *Pelodytes*. Maximum clade credibility tree recovered by *BEAST, showing 95% highest posterior density intervals for split times (bars) and posterior probabilities for each node. Also shown are values of bootstrap support (in %) recovered in MP-EST analyses. Scale (bottom) in millions of years.

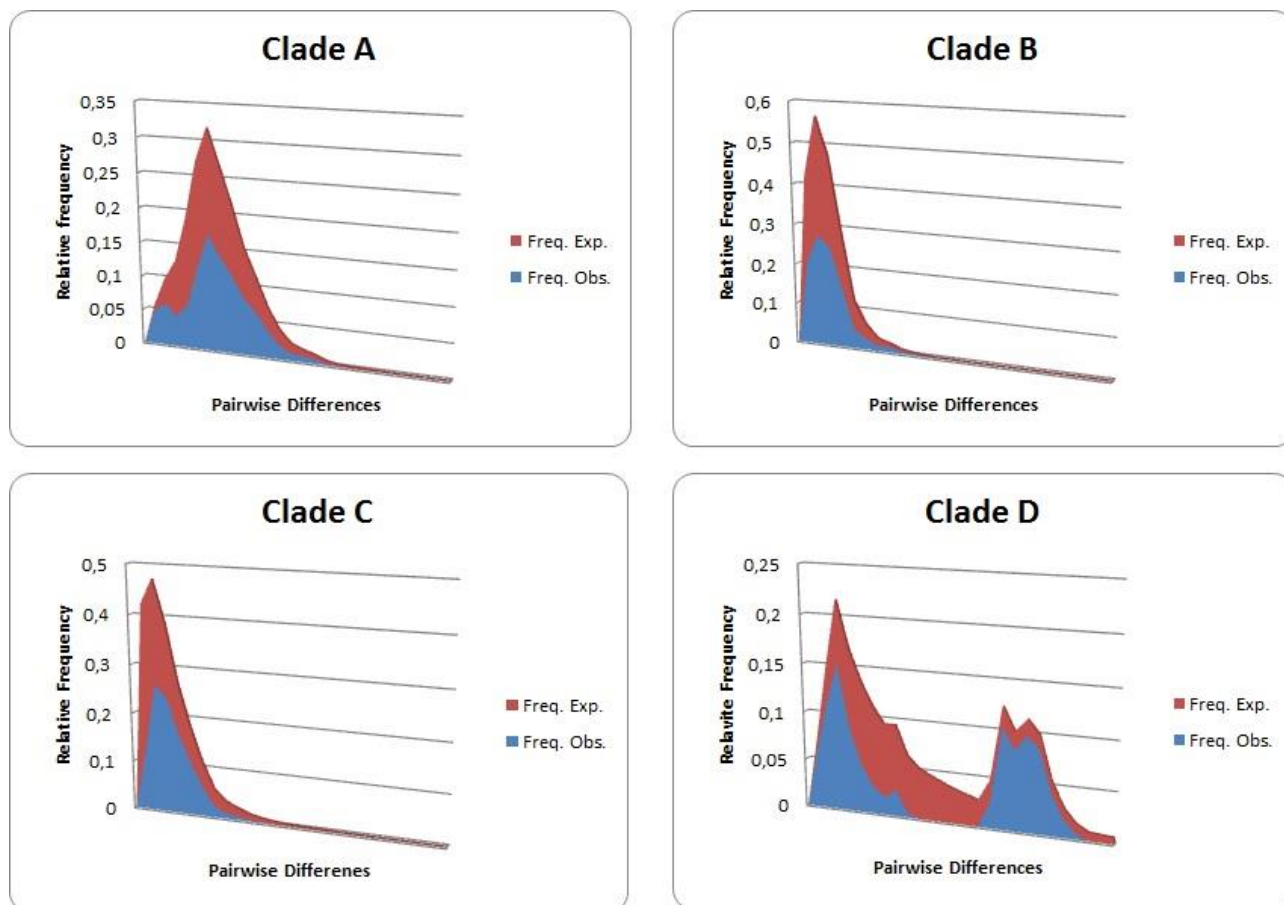


Fig. S1. Mismatch distribution plots for each mtDNA clade in *Pelodytes*. The blue curve shows the distribution of the observed pairwise nucleotide site differences and red curves the expected values in growing and declining populations.

CAPÍTULO 2: Taxonomía de cara a la especiación críptica: integración de datos moleculares, bioacústicos y morfológicos revelan dos nuevas especies de *Pelodytes* en la Península Ibérica

Integration of molecular, bioacoustical and morphological data reveals two new cryptic species of *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae) from the Iberian Peninsula

JESÚS DÍAZ-RODRÍGUEZ^{1,2,*}, MARCELO GEHARA³, RAFAEL MÁRQUEZ⁴, MIGUEL VENCES⁵, HELENA GONÇALVES^{2,6}, FERNANDO SEQUEIRA², IÑIGO MARTÍNEZ-SOLANO⁷, MIGUEL TEJEDO¹. Accepted in *Zootaxa*.

¹ Department of Evolutionary Ecology, Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Avenida Américo Vespucio, s/n, 41092 Sevilla, Spain

² CIBIO-InBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão, Universidade do Porto, 4485-661 Vairão, Portugal

³ DBEZ—Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário Lagoa Nova, Natal, RN 59078-900, Brazil

⁴ Fonoteca Zoológica & Dept. Biodiversidad y Biología Evolutiva. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. Spain

⁵ Division of Evolutionary Biology, Zoological Institute, Technical University of Braunschweig, Mendelssohnstr. 4, 38106 Braunschweig, Germany

⁶ Museu de História Natural e da Ciência da Universidade do Porto (MHNC-UP), Praça Gomes Teixeira, 4099-002 Porto, Portugal

⁷ Department of Wetland Ecology, Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Avenida Américo Vespucio, s/n, 41092 Sevilla, Spain

* Corresponding author: e-mail: byosss@gmail.com

Abstract

Parsley frogs (*Pelodytes*) comprise the only genus in the family Pelodytidae, an ancient anuran lineage that split from their closest relatives over 140 million years ago. *Pelodytes* is a Palearctic group restricted to Western Eurasia including three extant species: the eastern species *P. caucasicus*, endemic to the Caucasus area, and two closely species inhabiting Western Europe: the Iberian endemic *P. ibericus* and the more widespread *P. punctatus*. Previous studies based on mitochondrial and nuclear DNA markers have revealed the existence of two additional lineages of Parsley frogs in the Iberian Peninsula, which have been flagged as candidate species. Here, we integrate novel molecular, morphological and bioacoustical data to assess the differentiation of the four western Parsley frog lineages. Species trees and Bayesian population assignment analyses based on nuclear markers confirm previous studies and concordantly delineate four parapatric lineages with narrow hybrid zones. Mitochondrial divergence is low (< 2% pairwise distances in the 16S rRNA gene), in line with previously reported low mitochondrial substitution rates in non-neobatrachian frogs. Based on concordance between mitochondrial and nuclear markers, we conclude that four species of Parsley

frogs occur in Western Europe: *Pelodytes punctatus*, distributed from northern Italy to northeastern Spain; *Pelodytes ibericus*, inhabiting southern Spain and southern Portugal; *Pelodytes atlanticus* **sp. nov.**, from the Portuguese Atlantic coast; and *Pelodytes hespericus* **sp. nov.**, occurring in central and eastern Spain. However, bioacoustical and morphological differentiation of these species is low, with no obvious and qualitative diagnostic characters allowing full species discrimination. Differences in the relative size of metacarpal tubercles exist but this character is variable. *Pelodytes ibericus* and *Pelodytes atlanticus* are smaller than the other two species, and *P. ibericus* has shorter limbs and various distinctive osteological characters. Bioacoustically, the pattern by which two different note types are combined in advertisement calls separates *P. hespericus* from the remaining species. Despite these differences, we emphasize that the taxonomic status of all four western Parsley frogs requires additional investigation, especially the patterns of genetic admixture across contact zones. While a status of separate species best conforms to the currently available data, alternative hypotheses are also discussed.

Key words: Amphibia, Pelodytidae, cryptic species, species delimitation, population assignment, *Pelodytes punctatus*, *Pelodytes ibericus*, *Pelodytes atlanticus* sp. nov., *Pelodytes hespericus* sp. nov.

1. Introduction

Recognition of species as independent evolutionary lineages (de Queiroz 1998, 2007), rather than based on alternative species concepts, has been paramount for the development of integrative taxonomic approaches (Dayrat 2005), leading to improved operational protocols for species delimitation (Sites & Marshall 2003; Padial *et al.* 2010; Camargo & Sites 2013; Miralles & Vences *et al.* 2013; Carstens *et al.* 2013). The understanding of speciation as a lineage splitting process, with subsequent accumulation of emerging properties acquired during the course of divergence, has also served to define more clearly the sources of discordance among taxonomists. At what level of lineage splitting should diverging entities be recognized as species? Almost necessarily, there will be a vast number of incipient species that many taxonomists would fail to recognize –and name– as separate species-level entities, even if some of the properties required by different species criteria are met.

From a molecular perspective, species delimitation approaches based on a single locus tend to be misleading because of the pervasiveness of discordance among gene trees and species tree. Genealogies do not always match the speciation process due to recent divergence, hybridization, recombination, gene duplication and loss (Degnan & Rosenberg 2009). This undermines approaches relying on a single locus, especially for mtDNA, which is prone to showing genealogical discordance with respect to population history (e.g. see Ballard & Whitlock 2004). Focusing just on herpetology,

there are multiple examples of deeply divergent, co-occurring mitochondrial lineages (Zhang *et al.* 2008; Hauswaldt *et al.* 2011; Vences *et al.* 2013) suggesting patterns of recurring divergence and admixture, and of inter-species hybridization and mitochondrial introgression (Babik *et al.* 2003; Zamudio & Savage 2003; Renoult *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010; Komaki *et al.* 2012; Wielstra & Arntzen 2012; Singhal & Moritz 2012; Jezkova *et al.* 2013; Zielinski *et al.* 2013; Barrow *et al.* 2014). Ring species, such as North American *Ensatina* salamanders, also challenge classical species delimitation attempts (e.g., Wake 1997; Kuchta *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2011; Devitt *et al.* 2011; Monahan *et al.* 2012), as do other cases of local speciation processes blurred by hybridization (e.g., MacLeod *et al.* 2015). Islands provide further examples of genealogical discordance where founder effects or rapid adaptation to new environmental conditions can lead to the coexistence of different entities in the absence of substantial genetic divergence and, often, in absence of evident reproductive barriers other than the sea (Grazziotin *et al.* 2006). Whether in such cases a species status is warranted or a renaissance of the subspecies category is needed remains a controversial topic (Hawlitshchek *et al.* 2012). Leaving aside these borderline cases, it remains true that species diversity is often underestimated, especially in “non adaptive” or “cryptic” evolutionary scenarios (Bickford *et al.* 2007; Funk *et al.* 2012; Barley *et al.* 2013).

Pelodytidae is a relatively ancient family of anurans with a scarce number of taxonomic representatives in a single described genus: *Pelodytes* Bonaparte, 1838. According to molecular timetrees, the divergence of pelodytids from their sister group (pelobatids+megophryids) took place more than 140 million years ago (mya) (Roelants *et al.* 2007), as reflected in deep differences in karyological characters (Morescalchi *et al.* 1977). Pelodytid morphology is characterized by several plesiomorphic character states (Sanchiz *et al.* 2002; Garriga & Llorente 2011) and some physiological characters are also interpreted as plesiomorphic (Cardellini & Sala 1987), in agreement with the placement of this family outside of the derived crown group of anurans (the neobatrachians) (Duellman & Trueb 1986; Ford & Cannatella 1993; Irisarri *et al.* 2012). Species of Pelodytidae are restricted to the Western Palearctic region; they occur in the north Mediterranean and Caucasus areas, occupying the mesothermal climate zone (Escoriza & Ruhí 2014). According to current taxonomy, they comprise three extant species: *Pelodytes caucasicus* Boulenger, 1896, with a patchy distribution of isolated and threatened populations extending from the eastern shores of the Black Sea to the northern slopes of the Caucasus, occurs in northwest Azerbaijan (in the Belokany part of Zakatala State Reserve), Georgia (southwest and South Ossetia), and Russia (Krasnodar district) to its southern limit in north Turkey (Steiner 1968; Darevsky *et al.* 1971; Kuzmin 1997; Iskanderov 2009; Iğci *et al.* 2013). *Pelodytes ibericus* Sánchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom & Sanchiz 2000, is endemic to the

southern Iberian Peninsula (Portugal and Spain), occurring in populations associated with Mediterranean temporary ponds from Alentejo to Andalusia, occupying almost the entire region except the easternmost provinces (Crespo & Oliveira 1989; Barbadillo 2002a; Ceacero *et al.* 2007). Finally, *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1802) is discontinuously distributed from the Iberian Peninsula, in central and southwestern Portugal, eastern and central Spain, to France and northwestern Italy (Barbadillo 2002b; Salvidio & Bologna 2007; Crespo *et al.* 2008; Denoël *et al.* 2009; Guyétant & Geniez 2013).

The fossil record of *Pelodytes* documents the distribution of this genus in Europe from the Eocene to the Holocene (Roček & Rage 2000; Sanchiz 1998a; Lobo *et al.* 2016), and initial divergence among species of *Pelodytes* is ancient (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000; García-París *et al.* 2003; Veith *et al.* 2006). The vicariance of Iberian and Caucasian *Pelodytes*, estimated around the Oligocene - Miocene boundary (about 24 mya) (Sánchez-Herráiz 2004; Veith *et al.* 2006), roughly coincides with splits in other similarly distributed amphibian taxa, like *Chioglossa lusitanica* and *Mertensiella caucasica* (Veith *et al.* 1998; Steinfartz *et al.* 2000). The fossil taxon *Pelodytes arevacus*, Sanchiz, 1978, considered an early extinct member of the western *Pelodytes* clade, has been recovered from the Miocene in the Iberian Peninsula (Sanchiz 1978, 1998b; Sanchiz *et al.* 2002). Additionally, fossils morphologically ascribed to modern *Pelodytes* have been reported from sites in southeastern France from 4.2–3.2 mya (Blain 2009).

The genus was also present in the Miocene in other parts of Europe (Roček 2005) and one plausible biogeographical explanation is that the Iberian Peninsula has been a refugium and center of speciation for Pelodytidae since the Miocene (Sanchiz 1978), allowing for the recolonization of part of western Europe during the Pleistocene from the Iberian source (García-París *et al.* 2003). On the other hand, the absence of *Pelodytes* in north Africa (Mateo *et al.* 2003) supports the hypothesis that this genus colonized southern Spain when the Strait of Gibraltar was already a functional biogeographical barrier (Busack 1977).

Until the late twentieth century, all Western European populations of the genus were assigned to a single species, i.e., the Common Parsley frog *P. punctatus* (Arnold *et al.* 1978). After the initial discovery of bioacoustic differences between French and Italian *versus* southern Iberian populations (Paillette *et al.* 1992), detailed comparisons of morphology, osteology and allozymes led to the description of southern Iberian Parsley frogs as a new species, *P. ibericus* (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000). The distinctiveness of this species was subsequently confirmed by several additional studies (Pargana *et al.* 2003; García-París *et al.* 2003; Veith *et al.* 2006; Crespo *et al.* 2008; van de Vliet *et al.* 2012), although detailed analyses of contact zones between *P. ibericus* and *P. punctatus* were lacking until recently. Fine-scale genetic studies have revealed that the pattern of genetic differentiation in Parsley frogs in Iberia is more complex than previously thought, with two additional lineages,

suggesting a history of allopatric differentiation in multiple refugia during the Plio-Pleistocene with recent secondary contact between them (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015).

In the present study, we examine the differentiation among western lineages of Parsley frogs in detail, integrating molecular, bioacoustic and morphological approaches. This complex of species poses important problems to taxonomists due to the apparent lack of clear-cut bioacoustic and morphological differences, combined with low mitochondrial divergences among lineages, which are however congruent with population assignments based on independent nuclear gene sequences. Considering all available evidences, we conclude that two undescribed species-level taxa of *Pelodytes* exist in the Iberian Peninsula; these are here described as new species.

2. Material and methods

2.1. Fieldwork, sampling and external morphological measurements

For molecular purposes, 98 individuals of *Pelodytes* were sampled from a total of 45 localities distributed across the Western European range of the genus, including sites from the Iberian Peninsula, France and northern Italy (Fig. 1). Sample collection was completed in different fieldwork campaigns carried out from 2003 to 2014. Tadpoles were collected during the day by dipnetting in temporal ponds, following a protocol of asepsis to avoid biological contamination between sites. Adults were collected at night using torches and headlamps and frequently guided by the male advertisement call. We collected samples by tail- or toe-clipping from one to five individuals per population, releasing animals immediately in the place of capture (Supplementary Table S1). Tissue samples were preserved in ethanol or frozen.

Morphometric measurements were taken from 185 ethanol-preserved specimens from 55 populations (Supplementary Table S2), including vouchers from the natural history museums in Pittsburgh (CM: Carnegie Museum), Lisboa (MUHNAC: Museu Nacional de História Natural e da Ciência), Madrid (MNCN: Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC), Paris (MNHN: Muséum national d'Histoire naturelle), Bonn (ZFMK: Zoologisches Forschungsmuseum A. Koenig), München (ZSM: Zoologische Staatssammlung) and newly collected specimens deposited in Sevilla (EBD: Colección Científica de la Estación Biológica de Doñana-CSIC). Only specimens with complete datasets available (i.e., all measurements and reliable geographical information) were included in the morphometric analysis. The following morphological measurements were taken by JDR or MV with calipers to the nearest 0.1 mm: snout-vent length (SVL), maximum head width (HW), head length

(HL), horizontal eye diameter (ED), eye-nostril distance (END), nostril-snout tip distance (NSD), nostril-nostril distance (NND), horizontal tympanum diameter (TD), hand length (HAL), foot length (FOL), foot length including tarsus (FOTL), forelimb length (FORL), tibia length (TIL) and hindlimb length (HIL). Terminology and variable descriptions follow Sánchez-Herráiz *et al.* (2000) and Vences *et al.* (2010). The majority of specimens of lineage D and *P. caucasicus* were measured by MV and the remaining specimens by JDR; to minimize observer effects we therefore included only these specimens in the morphometric analysis, implying that comparisons between the three endemic Iberian lineages (*P. ibericus* and the two new species described herein) are fully comparable. Measurements of all specimens and observer information are given in Supplementary Table S2.

For detailed assessment of morphology and as type series of new taxa, a small number of representative voucher specimens were euthanized in an MS222 solution following the manufacturer's instructions, fixed in 5% formaldehyde, and preserved in 70% ethanol. Tissue samples of these specimens were taken before fixation by cutting pieces of muscle from the shank, and preserved separately in 70% ethanol. Specimens were sexed based on size and presence of nuptial pads, when present. Statistical analysis of morphological variables was performed in Statistica 7.1 (Statsoft Inc., 2007). We analysed males and females separately. Original measurements were size-corrected dividing them by SVL. We then performed for each size-corrected variable, and separately for males and females, pairwise Mann-Whitney U-tests and summarized all those variables that showed significant differences in each pairwise comparison, applying Bonferroni correction for multiple testing. For the graphical representation of data, we performed a Principal Component Analysis (PCA) and constructed scatterplots with the first three PCs.

2.2. Bioacoustic analysis

For bioacoustic analysis we recorded advertisement calls from Portugal (Mindelo, Coimbra, São Salvador, Castro Verde, Mértola and Vila do Bispo) and Spain (Córdoba, Burgos, Sevilla, Jaén, Málaga, Almería, Barcelona and Valencia), and retrieved published recordings from France in websites (see Supplementary Table S3). We also analyzed recordings kindly provided by Almudena González (Fonoteca Zoológica Nacional: www.fonozoo.com), Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC), Eloísa Matheu and Richard G. Bowker. Our new recordings were made with professional grade microphones and recorders, and saved as uncompressed files. Microphones included Sennheiser ME 60 and recorders included Marantz PMD 221, Sony Walkman WMD6-C cassette, Sony TC-D8 DAT and Nokia C7-00. Substrate water temperature at the exact location where *Pelodytes* calling males emitted was measured with either a Miller and Weber quick-recording thermometer or with a Fluke 52 thermocouple thermometer (precision 0.1°C). Not all recorded males could be captured but, for those that were, SVL was measured to the nearest mm by pressing the frog flat (ventral side)

against a ruler. All the analogue recordings obtained were converted to digital format (41 KHz and 16 bit) with a Digi 001 or a Delta 66 digitizing board and were subsequently analyzed using Raven software (Cornell University) at the facilities of Fonoteca Zoológica Nacional.

In most cases, except where otherwise stated, our call descriptions refer to the entire available recording (or a large part of it) from a single individual (the call voucher). Given the difficulty and the time necessary for locating calling males, we preferred obtaining recordings of good quality of an unambiguously identified calling male (i.e., vocal sac seen moving during call emission) than recording multiple individuals. However, for all species, additional individuals were heard in the field and found to agree in the relevant call characteristics with the recorded ones (frequency, note duration and composition of syntax). Air temperature was recorded using different digital thermometers; temperature information refers to air temperature at the time of recording or water temperature of the calling specimens (see Supplementary Table S3). Body temperature was also measured for some of these recorded males. More specific information on recording equipment and methods for some of the data have been previously described (Paillete *et al.* 1992; Pargana 1998; Sánchez-Herráiz *et al.* 2000; Márquez *et al.* 2001; Pargana *et al.* 2003).

Exploratory data analysis suggests that differences between lineages and species of *Pelodytes* are comparatively low for bioacoustic characters often used in taxonomy, such as call rate, note duration, or dominant frequency. Furthermore, the available data are too scarce and limited to perform detailed statistical comparisons after correcting for the influences of temperature and body size. Therefore, we decided to compare species based on the main advertisement call structure, which is the feature already highlighted by Paillette *et al.* (1992), Pargana (1998) and Sánchez-Herráiz (2004) and that could be species-specific, also among closely related species, and it is furthermore known to differ between *P. caucasicus* and the species of the western clade. Unlike the advertisement call of *P. caucasicus*, which is composed of three notes in a fixed sequence, the calls of all Western European *Pelodytes* consist of two note types that are arranged in series of specific syntax, or are emitted (more rarely) as single-note calls. These note types are here named **A** and **B**. Mostly they are arranged in **AB** series, sometimes followed by additional **B** notes, and sometimes a single **A** note is emitted. In order to assess differences in the arrangement of notes per call, we analyzed all available recordings and counted: (i) the number of calls consisting of isolated **A** notes, and (ii) the number of calls consisting of, respectively, one note **A** followed by one or more notes of type **B**, i.e., the number of **AB** calls, **ABB** calls, **ABBB** calls, up to **ABBBBBBBBB** calls. Furthermore, we also summarized (iii) the proportion of **AB** series, independent of the number of additional **B** notes by which they are followed, relative to single-note calls, and (iv) the average number of **B** notes following **AB** series. For the

analysis, we attempted to discriminate individuals separately, although, from some recordings, to determine the number of calling individuals and assign each call to one of the individuals presented inherent difficulties. We observed differences in total number of notes related to body temperature. So, we attempted to increase time of the records measured at low temperature to use a similar average number of notes. Statistical analysis was also performed in Statistica 7.1 and we undertook every effort to use one calling individual and the proportion of note types in its call as the sampling unit for analyses.

2.3. Molecular analysis

In a previous study, Díaz-Rodríguez *et al.* (2015) analyzed 391 individuals of *Pelodytes* from 162 localities, for two mitochondrial and two nuclear markers. In the present study, we selected 98 individuals from representative populations covering the range of the western lineages identified by Díaz-Rodríguez *et al.* (2015) (Fig. 1). Samples were selected so that they included populations from the core of the range of all lineages, but in addition, we focused on all putative contact zones among lineages. Therefore, admixed populations and hybrid individuals are overrepresented in our data set, compared to their overall scarcity in Díaz-Rodríguez *et al.* (2015).

Total genomic DNA was extracted from tissue samples after Proteinase K (10mg/ml) digestion and using a standard high-salt protocol (Sambrook *et al.* 1989), or a HotSHOT alkaline lysis protocol following Truett *et al.* (2000), or, for oldest samples and difficult extractions, the commercial DNA extraction kit Dneasy® Tissue (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. DNA sequences of two mitochondrial (mtDNA) and six nuclear (nDNA) gene segments were analysed; mtDNA: 705 bp of cytochrome b (mt-CYB), and 788 bp of NADH dehydrogenase subunit 4, including adjacent tRNAs (mt-ND4); nDNA: 1309 bp of recombination-activating gene I (RAG1), 801 bp of leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein (KIAA1239), 752 bp of intron 7 of β -fibrinogen (β -*fibint7*), 637 bp of intron 5 of ribosomal protein L3 gene (*RPL3int5*), 676 bp of intron 7 of calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein gene (*Cherpint7*) and 935 bp from intron 4 of protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform (*PPP3CAint4*). Furthermore, we sequenced two additional mitochondrial DNA fragments, the 16S ribosomal RNA gene (16S) and cytochrome oxidase subunit I gene (mt-CO1) from four individuals representing each of the major mtDNA lineages, using primers 16Sar-L and 16Sbr-H of Palumbi *et al.* (1991), and LCO1490 and HCO2198 of Folmer *et al.* (1994).

Sequences for the majority of the gene segments were from Díaz-Rodríguez *et al.* (2015), and sequences of two nuclear markers (*RPL3int5* and *Cherpint7*) previously published by Pinho *et al.* (2010) were also included, complemented with a few additional specimens filling geographical

sampling gaps and with the newly sequenced RAG1 and KIAA1239 fragments (see Supplementary Table S1). All markers were amplified via polymerase chain reaction (PCR) using the following combination of primers and cycling conditions. For mt-CYB, reactions were performed with primers L14724 (Irwin *et al.* 1991), and MVZ16 (Moritz *et al.* 1992), with an initial denaturation at 94°C for 180 s and 35 cycles [92°C, 40 s; 47°C, 60 s; 72°C, 90 s], followed by final extension at 72°C for 300 s. For mt-ND4 we used primers ND4 and Leu of Arévalo *et al.* (1994), with 94(300), [94(40), 56(60), 72(80) x 35], 72(300). For RAG1 and KIAA1239 we performed nested PCRs with two pairs of primers each (KIAA1239F1, KIAA1239R2, and KIAA1239NF1, KIAA1239NR1; Rag1-MartF11, Rag1-MartR6, and Rag1-AmpF2, Rag1-UC-R) as in Shen *et al.* (2012) and Rakotoarison *et al.* (2015), with 94(240), [94(45), 45(40), 72(120) x 45], 72(600). For PPP3CA*int4* we used primers PPP3CA5PeIF and PPP3CA5R1 and R2 (Pinho *et al.* 2010) with 95(300), [92(30), 50(30), 72(90) x 40], 72(300). For β -*fibint7* a two-step amplification procedure was used, with a combination of two primer pairs (FIBX7 and FIBX8; BFXF and BFXR) as described by Sequeira *et al.* (2006), with 94(180), [94(40), 50(60), 72(90) x 40], 72(300) for the first PCR and 94(180), [94(40), 56(60), 72(90) x 40], 72(300) for the second PCR. PCRs were carried out in a total volume of 10 μ l, containing 1 μ l PCR buffer (50 mm Tris-HCl, 50 mm NaCl, pH 8.5), 2.5 mM of MgCl₂; 0.25 mM of dNTPs, 0.3 μ M of each primer, 0.5 U Taq polymerase (Biotaq®, Bioline, EcoGen and Promega DNA Polymerases) and approximately 50 ng of genomic DNA.

PCR products were enzymatically purified with the ExoSap-IT purifying kit (Amersham-Pharmacia Biotech), Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase, or Antarctic Phosphatase, or Montage PCR columns (Millipore) according to the manufacturer's instructions, and clean products were subsequently cycle-sequenced in both directions using dye-labeled dideoxy terminator chemistry (BigDye 3.1 and ABI Prism Big Dye Terminator Cycle) on ABI PRISM® 3130xl automated DNA sequencers (Applied Biosystems). Chromatograms and sequences were checked by eye, edited and manually corrected using Bioedit v7.2.5 (Hall 1999) or CodonCode Aligner 5.1.4 (CodonCode Corp.); protein-coding sequences were aligned by hand and translated into amino acids for authentication; non-coding sequences were aligned with the Muscle algorithm under default settings implemented in Mega 6 (Tamura *et al.* 2013). Polymorphic positions corresponding to heterozygous individuals in nuclear loci were coded with IUPAC ambiguity codes. In all nuclear markers, regions in the alignment that could not be unambiguously edited or aligned due to the presence of indels or of short repeats were excluded prior to further analyses (reported alignment sizes take into account exclusion of these sites). Nuclear gene segments were separated into haplotypes using the Phase algorithm (Stephens *et al.* 2001; Stephens & Donnelly 2003) as implemented in DnaSP 4.1 (Librado & Rozas 2009). All

sequences newly determined for this study are deposited in GenBank ([accession numbers KX984154–KX984239](#); see Supplementary Table S1).

We assessed the probability of recombination in nuclear DNA sequences with Topali v2.5 (Milne *et al.* 2004), using the difference of sums of squares (DSS) method with a sliding window of 500-bp and 10-bp step size (100 bootstrapping threshold runs), and the PhiTest implemented in Splitstree v4.2 (Huson & Bryant 2006). We did not find statistically significant evidence for recombination in nuclear sequences, therefore deemed adequate to use them for phylogenetic analysis.

2.4. Species delimitation

In order to delineate independent evolutionary lineages, we assembled three different molecular datasets: (1) a combined alignment of the two mitochondrial genes mt-CYB and mt-ND4 (1493 bp) to identify major mitochondrial lineages; (2) a set of all available nDNA loci for for the median-joining networks and population assignment tests using the software Structure; and (3) a combined mtDNA/nDNA dataset for estimation of the species tree, obtained after excluding all samples previously identified as potential hybrids by the Structure analysis or collected from putative secondary contact zones. Additionally, (4) we used partial sequences of the mitochondrial 16S and mt-CO1 genes from four individuals to estimate pairwise sequence divergences among the four major mtDNA lineages.

In a first step, we explored our dataset by comparing mtDNA haplotypes (dataset 1) and nDNA (dataset 2) following the approach suggested by Weisrock *et al.* (2010). This approach seeks concordance between mtDNA clades and nDNA population clustering and was found to outperform other species delimitation approaches by Miralles & Vences (2013). Median-joining networks were constructed using Network v4.612 software (Fluxus Technology, <http://www.fluxus-engineering.com/>). For mtDNA, assignment of haplotypes to lineages was also determined by phylogenetic algorithms, as implemented in HapView v4.2 (Salzburger *et al.* 2011). Phylogenetic relationships among haplotypes were estimated using a Maximum Likelihood (ML) approach with RaxML v7.2.7 (Stamatakis 2006) on the Cipres Science Gateway V. 3.1 (Silvestro & Michalak 2010). Each marker was analyzed as an independent partition, with nucleotide substitution models selected by jModeltest v 2.1.1, based on the Bayesian Information Criterion (Darriba *et al.* 2012). Genetic distances (p-uncorrected) within and between major clades were calculated with Mega 6 (Tamura *et al.* 2013).

We analyzed nDNA data with the Bayesian population assignment algorithm implemented in the software Structure v2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000), avoiding any pre-clustering information for populations, with a data set for 52 individuals with unambiguous nuclear sequences and excluding

individuals with a considerable amount of missing data (> 90%). We used as input a genotype matrix of the sequence data (95 variable sites across 6 unlinked nuclear markers) that was generated using the software *xmfa2struct* according to Falush *et al.* (2003). To determine the optimal number of clusters (K), and after initial testing (10 independent replicates and 100,000 iterations for each K value), five independent simulations with 10,000 burn-in iterations and 1,000,000 iterations were performed using the linkage model, with correlated allele frequencies among populations and without spatial information. The optimal number of genetic clusters (K) was determined by comparing the log-likelihood of runs considering K values between 1 and 7 and, subsequently, by computing values of Delta K (Evanno *et al.* 2005), as implemented in Structure Harvester (Earl & von Holdt 2012). For visualization purposes, we combined values from different run replicates under the optimal K value with Clumpp as implemented in Clumpak (Jakobsson & Rosenberg 2007; Kopelman *et al.* 2015).

2.5. Species tree analysis

Species trees were estimated using the multispecies coalescent-based method implemented in *BEAST (Heled & Drummond 2010). Since the coalescent model of *BEAST does not account for migration as a source of genealogical discordance, we used the Structure results, haplotype networks and geographic information to exclude from the dataset individuals and localities identified as potentially admixed. All individuals from populations in a putative secondary contact zone or where mtDNA haplotypes from different lineages were found in sympatry were thus excluded.

We estimated two species trees, one using the complete dataset (mtDNA + nDNA) and another one using only the nuclear loci. For each locus, we selected the substitution model using jModeltest under the Bayesian Information Criterion. We used a Yule speciation prior with a strict clock model for all loci. Exploratory runs using relaxed clock models resulted in poor chain mixing and low effective sample sizes. Also, the posterior distribution of the standard deviation of the molecular clock rate (ucl.d.stdv) included zero, suggesting that the strict clock model provides a good fit for these markers. To calibrate the species trees, we set a normal prior for the age of the root based on fossil evidence as available in Böhme & Ilg (2003) (fosFARbase, <<http://www.wahre-staerke.com/>>). According to this information (see Introduction), we set the mean of this prior distribution at 3.5 mya with a SD of 1 mya. We also truncated the normal distribution at 3.5 mya to force the roots of both trees to be equal or older than this date. For each of the two species tree analyses, four independent MCMC chains with different seeds were run for 100 million generations. Trees and other parameters were sampled every 10,000 generations. We used Tracer 1.6 (Rambaut *et al.* 2014) to check for

adequate mixing and convergence of results across runs. We summarized the results in TreeAnnotator with 10% burn-in, and visualized them using FigTree v1.4.1 (<<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>).

3. Results and Discussion

3.1. DNA sequences and genetic diversity

Amplification of mtDNA (mt-CYB and mt-ND4) was successful in 90 from a total of 98 individuals selected for this study, yielding a mitochondrial DNA alignment of 1493 bp with 55 unique haplotypes (154 variable and 132 parsimony-informative sites). Additionally, a different number of individuals were sequenced for RAG1 (1309 bp), KIAA1239 (801 bp), *β-fibint7* (752 bp), PPP3CA*int4* (with a short fragment of 393 bp and a large fragment of 935 bp), RPL3*int5* (637 bp) and Cherp*int7* (676 bp). Supplementary Table S1 lists all the individuals sequenced for each marker. Genetic distances between lineages and estimates of genetic diversity are shown in Tables 1 and 2, respectively. The average number of pairwise sequence differences (percent of uncorrected p-distances) between the four major mtDNA clades in two mitochondrial gene segments, commonly used for DNA barcoding of amphibians, 16S and mt-CO1 (e.g., Vences *et al.* 2005) ranged from 0.8% to 1.7% for 16S, and from 4.1% to 6.7% for mt-CO1. Díaz-Rodríguez *et al.* (2015) reported interspecific pairwise sequence differences (p-distance values) from 3.3% to 4.5%, and intraspecific values from 0.1% to 0.6% for mt-CYB+mt-ND4. Haplotype diversity was higher in *β-fibint7* than in the other nuclear loci and values of nucleotide diversity were low, especially in KIAA and RAG1; for the combined fragment of mt-CYB and mt-ND4 we found considerable levels of genetic diversity (Table 2).

3.2. Mitochondrial differentiation

The geographical distribution of our sampling (Fig. 1) and the median-joining network for mtDNA haplotypes (Fig. 2) reveal that haplotypes clustered into four well-differentiated geographical groups, here named haplogroups A, B, C and D. These results fully correspond to the tree-based analysis of the previous study (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015), which included a much larger set of mtDNA sequences from 384 individuals (excluding the outgroup). *Pelodytes ibericus* (haplogroup B) is distributed in southern Iberia, with a widespread central haplotype and a number of more geographically restricted haplotypes of which one differed by seven mutations and all others by 1-3 mutations from the central haplotype. *Pelodytes punctatus sensu stricto* (haplogroup D) includes two haplotype subgroups, one of which occurs from Catalonia to Northwestern France and a second one restricted to Southern France and Northwestern Italy. Haplogroup A occurs in localities scattered

along the Atlantic coast of Portugal and its haplotypes showed some structure corresponding to populations from northern vs. southern Portugal. Haplogroup C occurred in the south, center and east of the Iberian Peninsula, intercalated between the distribution ranges of haplogroups B and D. In some populations, two different haplogroups were found (i.e., mitochondrial haplotypes of two lineages co-occurring in the same population), especially in areas of close geographic proximity between them (haplogroups A+B, populations 8, 9, 10, 11; and haplogroups B+C, populations 22 and 23). We did not find localities with mtDNA haplotypes of haplogroups C+D occurring in sympatry.

Sequence divergence among these four haplogroups greatly exceeded within lineage divergence. In the mt-CYB+mt-ND4 segment, the minimum number of mutational steps between haplogroups was 45-73, whereas the maximum number of mutational steps within haplogroups was 9-14 within clades A-C and slightly higher (22) within haplogroup D, reflecting its subdivision into two subgroups.

3.3. Molecular species delimitation based on nuclear DNA

Haplotype networks based on nuclear sequences are shown in Fig. 2, with samples colored according to each of the four mtDNA haplogroups. Results were largely congruent but instances of cyto-nuclear discordance were observed. Individuals with mtDNA of one haplogroup and nuclear alleles of a different one occurred in essentially the same localities in which co-occurrence of different mtDNA haplogroups was also observed (Supplementary Table S1; Fig. 1).

According to the population assignment analysis of Structure, the mean log-likelihood value and Delta K were clearly higher for K = 4, indicating that this is the optimal number of genetic clusters for the nuclear data. The four clusters match closely the four mtDNA haplogroups (Fig. 3). Concordant results were obtained in five independent replicates of the analysis. When running the analysis with K=5, 6, or 7, *P. punctatus sensu stricto* was divided into two clusters, corresponding to the two mitochondrial subgroups in this species (Fig. 2). In the K=4 analysis (Fig. 3), a number of individuals, belonging to putative secondary contact zones, had intermediate assignment probabilities to more than one genetic cluster, suggesting admixture/hybridization. These include localities with a considerable degree of admixture between adjacent lineages: 7 to 11 (lineages A+B), 23 (lineages B+C), and 36–37 (lineages C+D). Lower levels of admixture (less than 25%) were also observed in localities far from putative contact zones (localities 28 and 44), which are interpreted as uncertainty in population assignment resulting from incomplete lineage sorting.

Altogether 9–10 individuals could potentially represent hybrids based on these results, especially for one individual with nDNA and mtDNA discordance (blue with haplogroup B in figure 3) from Mestanza (locality 23), where individuals assigned to *P. ibericus* and lineage C were found in strict sympatry (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015). Although this appears to be a high proportion, it needs to be emphasized that the specimens from putative contact zones included in the present study had a high representation (> 30%) because we were particularly interested in identifying the occurrence and extent of hybridization. Considering the entire range of the species, admixed populations and hybrid individuals are rare (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015) and likely only present in contact zones.

As suggested by Weisrock *et al.* (2010), concordant placement of individuals by (i) mitochondrial DNA phylogeny and (ii) Structure clustering results is an indication for evolutionary independence of lineages and, thus, of species status. The fact that the four clusters of *Pelodytes* can be reliably identified by nuclear gene sequences, except for a limited number of individuals from their geographical contact zones, suggests that they are good candidates for representing independent evolutionary lineages, justifying their recognition as distinct species below.

3.4. Species tree analysis

The independent replicates of the species tree analysis produced convergent parameter estimates. Each replicate showed good chain mixing with high effective sample sizes for all parameters (> 500). Posterior probability values in the species tree estimated from mtDNA + nDNA sequences (Fig. 4) reached values at internal nodes of 0.82 and 0.93, supporting the same topology as the analysis based only on nuclear genes for splits among the Western Palearctic species..

Previous divergence estimates have recovered *P. ibericus* as the earliest split in the western species group, after the divergence of *P. caucasicus* (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000; Sanchiz *et al.* 2002; García-París *et al.* 2003, Díaz-Rodríguez *et al.* 2015) with an average age between 3.3–3.7 mya. Our own divergence estimates agree with this estimate and date all splits within the western *Pelodytes* to either the Pliocene or the Pleistocene. Using a fossil calibration (former fossils morphologically ascribed to *P. punctatus* were reported in Sète, Cap de Lazaret, Hérault), we obtained an age around 3.8 mya (95% HPD: 3.5 – 4.6 mya) for the initial split among western *Pelodytes* lineages (Fig. 4) in the Iberian Peninsula (including *P. ibericus*) (PP = 1.00). The split of lineage A from the remaining lineages was recovered with a more recent age around 3 mya (95% HPD: 2.2 – 4.0 mya). Lineages C and D were recovered as sister lineages, with an age for their split around 2.3 mya (95% HPD: 1.1 – 3.4 mya), together forming the sister clade of the lineage A. The species tree estimated from nDNA sequences (Fig. 4) resulted in similar splits but with lower support values, placing *P. ibericus* as diverging from the rest of the Iberian *Pelodytes* around 3.7 mya, followed by lineage A, which again

was recovered as sister group of the other two major lineages (C and D). This hypothesis suggests an eastwards expansion from southern Iberia, with stepwise differentiation during the Pliocene and upper Pleistocene.

On the other hand, repeating the analysis calibrated with an average anuran mtDNA substitution rate (no node constraint; substitution rate prior for mtDNA set at 1%), as often reported in the literature, recovered instead very young ages (< 1 mya) for all splits. However, these young divergence dates might be underestimated. In fact, as with several other archaic frog lineages, *Pelodytes* are characterized by low mitochondrial substitution rates (e.g., Hoegg *et al.* 2004; Irisarri *et al.* 2012). Analyses assuming a slower rate (0.5% divergence per mya) result in divergence estimates of 1.7 mya for the initial split, and of 0.7 mya for the most recent split within the Western Palearctic *Pelodytes* (data not shown), thus still supporting Pleistocene divergences. A re-evaluation of *Pelodytes* fossils and the use of multiple such fossils for calibration, is needed to obtain a more robust timetree estimate of *Pelodytes* in future studies.

3.5. Morphological differentiation

Careful examination of voucher specimens did not yield any reliable and fully diagnostic qualitative morphological difference between any of the cryptic species of Parsley frogs. The genetically divergent *Pelodytes caucasicus* is morphologically distinct from the western lineage, e.g. by larger body size (SVL 43.7–50.3 mm vs. 22.7–41.6 mm according to examined specimens) and by the presence of more continuous warty longitudinal ridges on the back, but this species is not further considered here. Among the western species, we focused on subarticular tubercles, which have been previously found to differ among species of *Pelodytes* (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000). We noted a tendency for subarticular tubercles, being small and conical in lineages A and C, and in *P. ibericus* vs. more rounded in lineage D (*P. punctatus sensu stricto*), and for metacarpal tubercles, showing different relative sizes among individuals belonging to some of the different lineages. However, these differences were not obvious in all specimens and in a large series of specimens that we examined, a high amount of individual variation was noted (Fig. 5).

Morphometric measurements were available from 133 males and 44 females of the four western lineages of *Pelodytes* (i.e., excluding *P. caucasicus*). Original measurements are included in Supplementary Table S2, while a summary of the original measurements and ratios is given in Table 3. For morphometric comparisons, we used a subset of specimens of *P. punctatus* (lineage D) measured by MV and of the rest of lineages only those specimens measured by JDR, thereby

maximizing the comparability among the three endemic Iberian lineages. It therefore needs to be taken into account that comparisons with lineage D (*P. punctatus sensu stricto*) might be compromised due to possible observer effects. Since our goal in this study is not a comprehensive morphometric comparison but, instead, the search for easily reproducible differences between species, we here rely mostly on simple comparisons of morphometric ratios against SVL. Pairwise univariate comparisons among the four western lineages of *Pelodytes* with Mann-Whitney U-tests (Table 4) revealed differences in numerous variables, but only a subset of these remained significant after Bonferroni correction. Comparisons were carried out separately in males and females and yielded overall congruent results. Considering Bonferroni-corrected results only, Lineage B (*P. ibericus*) and A were characterized by smaller body sizes than lineages C and D. Furthermore, *Pelodytes ibericus* differed from the other three lineages in having shorter limbs, affecting the majority of variables related to fore- and hindlimb length, and by a relatively larger tympanum in males (Fig. 6). A PCA on male values (including also *P. caucasicus*) found the first two PCs explaining over 80% of the variance (Table 5). A scatterplot of PC1 and PC2 separated *P. caucasicus* clearly from the western lineages along PC1, reflecting its larger body size (Fig. 6). Also lineage C and *P. punctatus sensu stricto* were weakly distinguished from lineages B (*P. ibericus*) and A along the size factor, whereas *P. ibericus* was the only species somewhat distinguishable from all others also along PC2, reflecting mostly differences in TD, ED, and limb length (Fig. 6; Table 5).

3.6. Bioacoustical differentiation

Despite acoustical attributes reflecting the complex and elaborate mating calls in Parsley frogs, calls of all four western lineages of *Pelodytes* are structurally similar, without qualitative differences *sensu* Vieites *et al.* (2009). Detailed measurements of temporal and spectral parameters will be reported in forthcoming publications, but they did not yield strong differences between the species.

In the field, we noticed apparent differences in note arrangements, previously reported in the literature, and thus we focused on the composition of **A** and **B** notes in a certain syntax or separately. Raw data are presented in Supplementary Table S3 (*P. ibericus* N=32; Lineage D N=13; lineage A N=39; lineage C N=16). A main difference was that specimens of lineage C typically emitted stereotyped advertisement calls consisting of **AB**, without additional **B** notes following the **AB** series, as were heard in the other lineages. These differences can be expressed statistically, as the average number of **B** notes following an **A** note in a series (Fig. 7). In this value, differences among species are highly significant in an ANOVA ($F = 19.95$, $P < 0.001$), and Tukey's post-hoc tests confirmed that lineage C differs from the other three lineages ($P < 0.001$ in all cases). Furthermore, *P. ibericus* differs weakly from lineage A by a larger average number of **B** notes in note series (Tukey's post-hoc test, $P =$

0.022), and this difference might also hold in comparison to lineage D, with a P-value close to significance ($P = 0.0565$).

Paillette *et al.* (1992) found differences in note arrangement among *P. ibericus* from Algarve and *P. punctatus* from France and Italy. According to these authors, the northern populations (*P. punctatus*) had a simple **AB** syntax, whereas *P. ibericus* emitted a variable number of **B** notes following **A** (see also Pargana *et al.* 2003). Although in our analysis the number of **B** notes repeated in calls of *P. punctatus* was lower than in *P. ibericus* (Fig. 7), this difference was not significant for lineage D, and we found the stereotyped **AB** calls rather typical for lineage C. Yet, calls heard (but not recorded) from specimens of *P. punctatus* near Vic (Girona, Spain) in March 2016 were composed of single **A** notes only (about 10 specimens heard calling during one hour). This lack of **B** notes in this *P. punctatus* population would rather be in agreement with the conclusion of a simple syntax in this species (Paillette *et al.* 1992), but it could also indicate intraspecific variation.

Márquez *et al.* (2001) did not find evidence of an increment of the number of “**B**” notes or call matching through male-male acoustical interactions in *P. ibericus*, suggesting that social interactions are not the main cause of this variability. Phonotaxis tests, based on differences of the number of **B** notes in a sequence, did not detect significant responses for attraction in females of lineage C (Sánchez-Herráiz 2004). The role of these differences in the note arrangements is not clear, nevertheless it could also be related to an increase of informative content through redundancy or other different functions (see Narins & Capranica 1978).

3.7. Integrative species delimitation

Although molecular, morphological and bioacoustical data revealed differences among the four western lineages of *Pelodytes*, the evidence is not fully conclusive. Molecular differentiation was congruent for mitochondrial and nuclear markers. Admixture and hybridization were observed in both sets of markers, but were apparently restricted to narrow contact zones, with no obvious introgression of nuclear or mitochondrial markers into the core ranges of each major lineage. Although the amount of mtDNA differentiation was low, the previous molecular species validation approach conducted by Díaz-Rodríguez *et al.* (2015) also supported the separation of the group into four distinct clades. Moreover, on the basis of the allozyme dataset analyzed by Sanchez-Herráiz *et al.* (2000), populations of *P. ibericus* presented exclusive alleles at loci AAT, EST-2, GDH and LDH-2, and fixed differences at three loci (IDPH-1, ME-3, and MPI-2) with respect to the Spanish populations of lineages D (Barcelona) and C (Burgos, Valencia) analyzed. *Pelodytes punctatus sensu stricto*, represented on

Sanchez-Herráiz *et al.* (2000) by the population of Barcelona, presented exclusive alleles in two loci: ADH-2, and LDH-1, the latter in high frequency (91.7%), whereas lineage C, represented by populations of Burgos and Valencia, also presented exclusive alleles in loci ADH-2, EST-2, GDH (2 alleles), and HK-2. While sample sizes were relatively low, these results are consistent with our study, suggesting genetic differences across the four lineages.

Morphological differentiation was limited to differences in size, limb length and tympanum diameter, with values overlapping among all lineages. In particular, *P. ibericus* differed morphometrically from the others, with some individuals, however, being less distinct (PCA, see Fig. 6); this agrees with the previously described morphological differentiation of *P. ibericus* (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000). According to the osteological analyses conducted by Sanchiz *et al.* (2002) and Sánchez-Herráiz (2004), *Pelodytes caucasicus* retained the most plesiomorphic morphology, resembling in multiple character states the putative common ancestor of extant *Pelodytes* species occurring in Iberia. These authors, analysing a total of 38 characters in disarticulated skeletons of individuals representing all four lineages characterized herein, i.e., from populations of *P. ibericus* (28 individuals from Cádiz, Huelva and Córdoba), lineage A (six individuals from Porto Covo), lineage C (eight individuals from Burgos, Madrid, Segovia and Valencia) and lineage D (seven individuals from El Garraf, Barcelona), concluded that there was a relatively low degree of evolutionary transformation in Iberian populations when using *P. caucasicus* as the outgroup. However, interspecific differences in character states were found between *P. ibericus* and *P. punctatus sensu lato* (which grouped populations here ascribed to lineage A, C and D) in, at least, 38 characters analysed in different skeletal parts: premaxillary, maxillary, nasal, sphenethmoids, frontoparietal, prootic, *ramus paroticus*, pterygoid, vomer, parasphenoids, parahyoids, vertebrae, scapula, coracoid, clavicle, humerus, radioulna, ilium, ischium, femur, tibiofibula and tibiale-fibulare.

In comparison to the other three western lineages, *P. ibericus* was characterized by several differences, especially at the cranial level: (i) frontoparietals narrower and the minimum distance between them larger; (ii) *septum nasi* proportionally wider and much shorter; (iii) sphenethmoids shorter; (iv) hyobranchial skeleton of parahyoid shape, with a wider angle between its anterior rods; and (v) compared to lineage C the cranium is shorter, wider, and more compact. On the other hand, the analysis of *Pelodytes punctatus sensu stricto* presented unique divergences in cranial ossification: greater robustness and ossification of most of the elements forming the cranial lid and greater compaction of skull. While new comparative osteological studies with increased sample sizes, explicitly comparing populations of the four western *Pelodytes* lineages, are needed, the levels of variation uncovered by Sanchiz *et al.* (2002) and Sánchez-Herráiz (2004) suggest that osteological characters may provide relevant taxonomic information and aid in species discrimination.

Regarding mating call characteristics, Sánchez-Herráiz (2004) found additional differences in the percentage of **B** vs. **A** notes, dominant and fundamental frequency, duration of the call and number of pulses between lineage C individuals from Valencia and Burgos and lineage B (*P. ibericus*) from Córdoba. Similarly, Pargana (1998) found a strong correlation between molecular (allozymes) and acoustic divergence (especially temporal parameters of **A** and **B** notes) between populations of *Pelodytes* in Portugal, lineages A and B. According to our results, advertisement calls of all four lineages are characterized by an overall structural similarity but differ in details of note arrangements, distinguishing *P. ibericus* from lineage A, but especially from lineage C by the absence of repetition of **B** notes. This same feature might also distinguish some populations of *Pelodytes punctatus* according to Paillete *et al.* (1992) although, on the basis of available recordings, we could not prove these results herein, neither in calls heard (not analyzed) from *P. punctatus* specimens in Southern France.

3.8. *Considering all the available evidence, should the lineages of Pelodytes occurring in the Iberian Peninsula be recognized as different species?*

Clearly, the amount of morphological and bioacoustical divergence among lineages is low. Despite the examination of a large number of specimens, we could not unambiguously identify any qualitative diagnostic external morphological character, as typically occurs in cryptic species, although differences in sizes of webbing fringes along the males from different lineages might exist (easily visible in live specimens). Bioacoustic differences were found, especially in the rareness of **B** note series in lineage C, although this is a quantitative character (*sensu* Vieites *et al.* 2009). Patterns of variation in the acoustic properties of mating calls are related to patterns of female choice (Gerhardt 1991) and phonotaxis playback tests should be conducted to determine the role of female discrimination among the calls of different species and to investigate the possibility of reproductive character displacement, with mating calls representing an effective prezygotic mating barrier in secondary contact zones.

The similar levels of mtDNA divergence (see Fig. 2) with the full concordance of mitochondrial and nuclear differentiation of the four lineages is a substantial argument supporting their evolutionary independence. However, compared with the generally high mtDNA divergences observed among species-level lineages in anurans, the pairwise divergences among *Pelodytes* haplogroups were comparatively low: for the two genes typically used for DNA barcoding in anurans, between-lineage divergences ranged from 4.1–6.7% in mt-CO1 and from 0.8–1.7% in 16S (Table 1). This mitochondrial differentiation is much below the threshold of 3% 16S divergence suggested by Fouquet

et al. (2007) and Vieites *et al.* (2009) for preliminary recognition of candidate species. However, these divergence values need to be taken in context as the 3% threshold was based on empirical evidence from neobatrachian frogs that are characterized by a substantial acceleration of mitochondrial substitution rates, whereas *Pelodytes* belongs to an ancient anuran clade with lower substitution rates (Hoegg *et al.* 2004; Irisarri *et al.* 2012), estimated at 0.0065 site/mya (95% HPD: 0.0047 - 0.0083) for the mtDNA fragments used herein. Furthermore, even in neobatrachians, Malone & Fontenot (2008) found postzygotic isolation in bufonid toads starting at mitochondrial divergences < 2.5%, and several undisputed species with low mitochondrial differentiation have recently been described (e.g., Vences *et al.* 2012; Mo *et al.* 2013). A low level of mitochondrial differentiation among species appears to characterize numerous groups of non-neobatrachian anurans. In the Pelobatidae, the sister group of Pelodytidae, several established and universally recognized species have similarly low divergence values, e.g., *Pelobates cultripes* vs. *P. varaldii* (0.9% 16S/12S rRNA divergence; Veith *et al.* 2006), or *Spea bombifrons* vs. *S. intermontana* (2.3% mt-CO1 divergence) and *S. bombifrons* vs. *S. hammondii* (with values as low as 0.7% 16S divergence) (García-París *et al.* 2003).

We conclude that, at the present, a species status for all four western lineages of *Pelodytes* is the hypothesis best fitting the available data, but we emphasize that future fine-scale studies, especially at putative secondary contact zones, are needed to better understand patterns of gene flow, as well as ecological differences between lineages. Although, based on current evidence and unpublished data on microsatellites, hybrid individuals are rare and limited to very narrow admixed populations, as in other pairs of taxa (e.g., Oliveira *et al.* 1991; Arntzen *et al.* 2009; Colliard *et al.* 2010), we cannot exclude that future studies may reveal wider patterns of introgression questioning species status.

Names are available for two of the lineages (*Pelodytes punctatus* and *Pelodytes ibericus*), and the remaining two lineages are formally described as species in the taxonomic accounts below. However, we do not exclude that new studies might require adopting an alternative taxonomic scenario.

3.9. Evolution of western Palearctic Parsley frogs

Our data confirm the existence of five independent evolutionary lineages of Parsley frogs and highlight the importance of the Iberian Peninsula as a refugium during climatic fluctuations specially in the Pleistocene. These climatic fluctuations may have consolidated a contemporary diversification process in western European *Pelodytes*, that probably started during the Pliocene (Sanchiz *et al.* 2002; García-París *et al.* 2003; Sánchez-Herráiz 2004; Díaz-Rodríguez *et al.* 2015).

Previous osteological (including fossils) and genetic datasets (molecular clocks) provide a basic time frame for *Pelodytes* differentiation. The most recent common ancestor (MRCA) of Iberian

Pelodytes probably lived between 3.3–3.8 mya (Sanchiz *et al.* 2002) according to allozymes and mtDNA (García-París *et al.* 2003; Sánchez-Herráiz 2004). Sanchiz *et al.* (2002), García-París *et al.* (2003) and Sánchez-Herráiz (2004) also indicated the existence of local differentiation within *P. punctatus sensu lato*, with Catalanian populations being clearly divergent from the rest of peninsular populations analysed (Burgos, Teruel, and Toledo, thus representing lineage C). The species tree analysis herein (Fig. 4), calibrated with fossils, recovered ages between 2.3–3.8 mya for the splits among the four lineages, with an estimated mtDNA rate (0.0065 site/mya; 95% HPD: 0.0047 - 0.0083) in agreement with the slow mitochondrial substitution rates typical of non-neobatrachian frogs.

Our preferred species tree, based on mtDNA and nDNA markers, suggests an ancient colonization of the southern Iberian Peninsula in agreement with previous studies (e.g., García-París *et al.* 2003; Sánchez-Herráiz 2004; Veith *et al.* 2006; Díaz Rodríguez *et al.* 2015). Molecular data are in agreement with the fact that fossils of *Pelodytes* have been recovered in the Iberian Peninsula dating back to the Middle Pliocene, about 3.6 mya, and by their absence in Northern Africa (Busack 1977; Sanchiz *et al.* 2002; Martínez-Solano & Sanchiz 2005; Blain *et al.* 2008a, b; Blain *et al.* 2009). Our species tree based only on nuclear DNA sequences is also consistent with this biogeographic scenario, with a topology where *P. ibericus* splits from a lineage containing the rest of Iberian *Pelodytes* (Fig. 4), although fossils ascribed to *P. ibericus* do not date back further than the Pleistocene (Lobo *et al.* 2016). According to the current calibration, the inferred splitting times in *Pelodytes* would be linked to paleogeographic events along the Pliocene and Pleistocene. The geographical ranges of the different species probably underwent cycles of demographic expansion and contraction related to the succession of glacial and interglacial periods, as evidenced by the widespread presence of fossil remains in Western Europe, dating from the Middle and Upper Pleistocene (Holman 1998; Roček & Rage 2000; Delfino 2002; Blain & Bailon 2003; Delfino 2004). Considering the ages obtained in our analysis (e.g., Fig. 4) and the accumulating evidence for climate-related diversification processes in the Iberian Peninsula, especially in amphibians and water-dependent species (Gómez & Lunt 2007; Abellán & Svenning 2014), scenarios involving separate Iberian refugia during climatic oscillations provide good null hypotheses to be further tested in future studies.

4. Taxonomy

4.1. *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1802)

Common Parsley frog

(Fig. 8)

Identity. – Described as *Rana punctata* Daudin, 1802, from a locality in France ("aux environs de Beauvais", Department Oise, northern France) (Frost 2015). One synonym, *Rana plicata* Daudin, 1802, from near Montpellier, France (Frost 2015). We could not locate the type specimens in the Paris museum (see also Frost 2015), but a more intensive search of that and other French collections might be warranted to ascertain the fate of the types of these two nomina. However, because the localities of both taxa are deeply in the range of the genetic lineage D, there is no doubt about the identity of this lineage with the name *Rana punctata*, and the status of *Rana plicata* as its junior synonym.

Morphology. – A medium sized frog with an average SVL of 35.5 mm (maximum SVL 41.6 mm) in males and 38.8 mm (51.0 mm) in females (Table 3). As all congeners its dorsal skin has tubercles and folds forming an irregular pattern of discontinuous dorsolateral folds, with considerable variation among individuals. Ventral side whitish, dorsally with irregular greenish dots and patches which typically are centered on the tubercles and folds, and sometimes extending around these. No webbing between fingers, weakly expressed webbing between toes. Males with distinct nuptial pads on fingers and arms. Further morphometric values are summarized in Table 3, and original measurements in Supplementary Table S2.

Distribution. – *Pelodytes punctatus* is widely distributed in France, extending into northwestern Italy (Liguria and Piedmont) and northeastern Spain (Catalonia) (Le Garff 1989; Salvidio & Bologna 2007). The northern limits are currently in the French department of Nord-Pas-de-Calais, where its presence is rare and limited (Duguet & Melki 2003). Fossil evidence indicates its existence further to the north in the past (Blain *et al.* 2014). In Italy, it is distributed in coastal Liguria (Salvidio *et al.* 2004), and in Piedmont (Boulenger, 1897) where it has recently been rediscovered (Andreone & Sindaco 1998; Sindaco *et al.* 2002). In the Iberian Peninsula, it is restricted to the northeast, including eastern Catalonia (Martínez-Rica 1983; Barbadillo 2002b), where it reaches its maximum altitude in the Pyrenees (2,000 m; Borrás & Polls 1987; Guixé *et al.* 2009). In France and Italy, *P. punctatus* inhabits plains (Guyétant *et al.* 1999; Salvidio *et al.* 2004; Pottier 2008), is absent from most of the French Pyrenees (Boulenger, 1897; Guyétant & Geniez 2013) and only exceeds elevations of 1,000 m in the Massif Central and in the Alpes Maritimes (Salvidio & Bologna 2007). The fossil record suggests an ancient presence of *P. punctatus* at the east of its present distribution (Blain & Bailón 2003; Delfino 2004). The current distribution is roughly within the region of subtropical climate with dry summers in the Koppen-Geiger classification (Peel *et al.* 2007), and extends into the oceanic temperate region in western France and the northeast of the Iberian Peninsula.

Natural History. – Numerous studies on *Pelodytes* biology have been performed in France, Italy and northeastern Spain and therefore the respective data can be reliably assigned to *P. punctatus*. This encompasses general accounts on the biology of the species (e.g., Elzen 1975, 1976), diet analysis of adults from Catalonia (Bea *et al.* 1994), and diet preferences of tadpoles (Richter-Boix *et al.* 2007). Reproduction is related to an increase in seasonal rainfall and occurs early in the year, usually before that of other anuran species, with two breeding periods: one at mid-fall and another in late winter and spring (Sindaco & Andreone 1988; Toxopeus *et al.* 1993; Guyétant *et al.* 1999; Boix *et al.* 2004; Egea-Serrano *et al.* 2005; Richter-Boix *et al.* 2006; Petitot *et al.* 2014). Reproduction in autumn is often minor and irregular (Cayuela *et al.* 2012), however, in southern populations the breeding season extends all year round (A. Montori pers. com.). This reproductive strategy may reduce interspecific competition (Jakob *et al.* 2003; Richter-Boix *et al.* 2006) and does not result in an inhibition of gene flow between early and late reproduction groups (Jourdan-Pineau *et al.* 2012). Breeding occurs in seasonal water bodies, mainly slow-flowing streams and ephemeral ponds located in cultivated areas, grasslands, shrubs and meadows (although the ponds often are more permanent than those used by *P. atlanticus* sp. nov. and *P. ibericus*). The species is frequently found at the entrance of caves and karstic sites (Elzen 1976; Olague & Lagares 2000; Sánchez-Herráiz 2004; Blain *et al.* 2008b; Vento & Pérez 2011). *Pelodytes punctatus* tolerates high levels of salinity and shows a preference for clayey soils as *P. hespericus* sp. nov. (but unlike *P. ibericus*, see however Reques and Tejedo 2014). Eggs are black and small (diameter 1.5–2 mm), arranged in strings of 70–80 mm length and containing 40–700 eggs. Overall clutch size can be up to 1,600 eggs (Boulenger, 1897; Lanza 1983; Toxopeus *et al.* 1993). Hatching success might be related to water oxygen content (Guyétant *et al.* 1999). The incubation period is 8–9 days at 14–20°C (Nöllert & Nöllert 1992). Larvae reach metamorphosis in roughly two months but this period can be delayed to up to four months (Sindaco & Andreone 1988; Guyétant *et al.* 1999), and up to eight months in hibernating larvae (Lataste, 1876). Phenotypic plasticity in morphology and larval development has been documented (Johansson and Richter-Boix 2013). Males reach sexual maturity at one year of age and females at two years and longevity can reach 8 years (in males) and 10 years (in females), similarly to other species of the genus (Esteban *et al.* 2004, Erişmiş *et al.* 2011). The sex ratio within a population is close to 1:1 (Toxopeus *et al.* 1993). The IUCN threat status of *P. punctatus* is Least Concern (Denoël *et al.* 2009); however, in the edge of its range (north of France, Italy and east of Spain), the species is generally scarce and highly threatened, due to the loss of breeding sites, close to local extinction in some areas (Parent 1989; Salvidio *et al.* 2004; Escoriza 2015).

Advertisement call and reproductive behavior. – The advertisement call of *P. punctatus* has been described by several authors (Hotz 1971; Elzen 1975; Paillete *et al.* 1992). Several call parameters (e.g., call duration) were found to depend on the temperature (Boulenger, 1897; Paillete *et al.* 1992). As with all western *Pelodytes*, the call consists of two notes (**A** and **B**) and has been reported as typically containing only a single **B** note following **A** (Paillete *et al.* 1992). Our analysis shows that also sequences of several **B** notes can be emitted following an **A** (Fig. 7), and it remains to be assessed by a more detailed study whether populational variation exists in the frequency of **B** series. Males call from positions partially or even completely submerged in the water, and occasional episodes of mortality due to sudden drops in temperature have been observed (Montori *et al.* 2011). Males remain for a longer period of time than females at the breeding sites and show a marked philopatry (Toxopeus *et al.* 1993). Female release calls have been mentioned by Elzen (1976). The amplexus is inguinal and usually lasts a few hours (Guyétant 1986).

Tadpole. – We assessed morphology in one tadpole in developmental stage 34 (field number ZCMV 14045, BL 22.2 mm, TL 44.5 mm, from Palamós, Catalonia). The examined tadpole has an elliptical body, a narrowly rounded snout in dorsal view, protruding eyes from the surface of the body and a very short tail with a typical braided line pattern; and spiraculum sinistral. The distance between eyes is moderately wide and nares are very large, round, positioned high dorsally, and situated nearer to snout than to eye and below the eye level. Moderately wide oral disk (Fig. 9b), emarginated, upper labium is wider than lower labium, LTRF is 5(2-5)/5(1-3). The upper jaw sheath is partially keratinized with pointed serrations, moderately wide without medial convexity. The lower sheath is wide V-shaped, partially keratinized and partially hidden by the upper one. Both jaw sheaths have a smooth surface. This tadpole is characterized by the presence of a network of dark lines, as it is also typical for larvae of the anuran genera *Bombina* and *Discoglossus*, covering the whole body, in addition to the presence of sparse dark spots. The venter is transparent with irregularly spiral shape intestinal coils.

4.2. *Pelodytes ibericus* Sánchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom, and Sanchiz, 2000

Iberian Parsley Frog

(Fig. 10)

Identity and Morphology. – This species was described and diagnosed from *P. punctatus* (including populations that we here consider as *P. hespericus* sp. nov.) based on morphometric, osteological and genetic (allozyme and mtDNA) differences by Sánchez-Herráiz *et al.* (2000). Its name-bearing type (holotype) is MNCN 23662 from "Doñana Biological Reserve (36° 59' N, 6° 27' W, elevation 10 m), Province of Huelva (Spain) (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000; Frost 2015). This

locality is well within the range of genetic lineage B (localities 50 and 52 in Díaz-Rodríguez *et al.* 2015, with specimens genotyped) and therefore assignment of this lineage to the nomen *P. ibericus* is straightforward.

Pelodytes ibericus is smaller than *P. hespericus* sp. nov. and *P. punctatus*, with a mean SVL of 31.2 (maximum SVL 37.2 mm) in males, and 33.3 mm (42.2 mm) in females (see Table 3). Average weight is 3.5 g in males and 4.9 g in females. The species is somewhat similar morphologically to *P. atlanticus* sp. nov., but most specimens have shorter limbs (Fig. 6) and an overall more compact body. Numerous differences in osteology have been detected by Sánchez-Herráiz *et al.* (2000) and Sanchiz *et al.* (2002), especially in the cranium, including a less elongated *tectum nasi*, larger scapular *crista anterior*, shorter parahyoid bone, and frontoparietals medially more widely separated in *P. ibericus* than in *P. punctatus*. The proximal subarticular tubercles of *P. ibericus* have been described as irregular and protruding conically, whereas in *P. hespericus* sp. nov. they are often more rounded (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000) but the variation of this character requires more careful study. Quite often *P. ibericus* has dorsally two crossed pale bands forming an X-shaped pattern.

Distribution. – The distribution range comprises a large area in the Southern Iberian Peninsula: from southeastern (Beja, Faro and Setúbal) to central provinces (Évora and Portalegre) of Portugal (Pargana *et al.* 2003; Crespo *et al.* 2008; van de Vliet *et al.* 2012), and in Spain, from northern Extremadura (Badajoz) (Palomo 1993; Da Silva 1994; Avilés *et al.* 1999; Muñoz del Viejo *et al.* 2005) and southern Castilla-La Mancha (Ciudad Real) (Ayllón *et al.* 2003; Sánchez-Herráiz 2004; Díaz-Rodríguez *et al.* 2015) to Andalucía. In this region, where 90% of its global distribution occurs, it is widely spread across the provinces of Huelva and Cádiz but rare in the east (Busack 1977; Fernández-Cardenete *et al.* 2000; Ceacero *et al.* 2007). Recent studies have outlined more precisely the distribution based on molecular markers (van de Vliet *et al.* 2012; Díaz-Rodríguez *et al.* 2015). The exact range limits are still partly unknown and new detailed molecular analyses of contact zones with other lineages are ongoing (Díaz-Rodríguez *et al.* unpublished data).

Natural history. – Notes on the natural and life history of this species have been provided by Díaz-Paniagua (1983, 1986, 1989, 1990), Tejedo (1991), Avilés *et al.* (1999), Barbadillo *et al.* (1999), Sánchez-Herráiz (2004), Díaz-Paniagua *et al.* (2005), and Reques (2014). *Pelodytes ibericus* reproduces in ephemeral water bodies, mainly temporary streams and seasonal ponds located around agricultural crops, grassland, scrub and oak from Mediterranean savanna. It tolerates some salinity, even at the larval stage, reproducing sometimes in salty coastal wetlands and inland brackish water lagoons (Reques & Tejedo 2014). It tolerates a variety of substrates (siliceous, clay and calcareous).

Phenological changes occur in dry years (Díaz-Paniagua 1989; Sánchez-Herráiz 2004). Breeding starts early in the season, avoiding interspecific competition (Díaz Paniagua 1988), often during autumn rains (October-November) in southern Portugal and Western Andalusia (Busack & Jaksic 1982; Díaz-Paniagua & Rivas 1987; González de la Vega 1988; Sánchez-Herráiz 2004; Reques 2014), and sometimes extends to March at higher latitudes (Badajoz: Avilés *et al.* 1999) and altitudes (Sierra de Cabra: Reques & Tejedo 1991; Sierra Morena: Reques 2000). Sexual maturity is reached at an age of one year (Sánchez-Herráiz 2004) and the maximum age is around six years (Reques 2014). The species is threatened by fragmentation and destruction of breeding habitat (van de Vliet *et al.* 2012), groundwater overexploitation and water pollution (Salvador & García-París 2001; Barbadillo 2002a; García-Muñoz *et al.* 2011) and predation by introduced species (Ceacero *et al.* 2007; Bosch *et al.* 2009; Nunes *et al.* 2014). Its IUCN threat status is Least Concern (Bosch *et al.* 2009) but a careful reassessment of its situation might be needed (Franco & Rodríguez de los Santos 2001; Pleguezuelos *et al.* 2002, 2004; Barbadillo 2002b).

Advertisement call and reproductive behavior. – The advertisement call of *P. ibericus* was studied by Paillette *et al.* (1992), Márquez *et al.* (2001), Sánchez-Herráiz (2004), Pargana *et al.* (2003), and Díaz-Paniagua *et al.* (2005). It is similar to that of other western *Pelodytes* lineages, consisting of two notes (**A** and **B**) with typically a series of various **B** notes following one **A** (Fig. 7). Each note has pulses distinctly spaced in the beginning and more concentrated towards the end; the pulsed part is relatively longer in the **B** note (Paillette *et al.* 1992; Pargana 1998; Sanchez-Herráiz 2004). Calling specimens are in or near the water, but they do not emit their vocalizations fully submerged. Reproductive activity takes place before and after sunset, mostly during rainy days accompanied by slight increases of environmental temperature, although they can also exhibit diurnal activity on rainy days (Avilés *et al.* 1999; Barbadillo *et al.* 1999).

Tadpole. – We assessed morphological characters in one tadpole in developmental stage 36 (field number ZCMV 14041, collected at Grazalema, Cádiz, BL 25.5 mm, TL 48.7 mm). The external morphology of this tadpole and two other specimens has a close similarity to those of *P. punctatus* except that the upper third row of keratodont has a very tiny gap only, or it is even absent, giving LTRF 4(2-4)/5(1-3) or 4(3-4)/5(1-3) and 5(3-5)/5(1-3) or 5(3-5)/5(1-3) (Fig. 9a).

Larvae have an omnivorous diet composed of algae, mainly Eukaryota and Chrysophyta, aquatic plants, fungi, arthropods and small debris (Díaz-Paniagua 1989; Díaz-Paniagua *et al.* 2005). Tadpoles of *P. ibericus* also predate upon embryos of other anurans (such as *Epidalea calamita*; Tejedo 1991).

4.3. *Pelodytes atlanticus* sp. nov.

(Fig. 11)

Identity. – Populations of this species have been considered as *P. punctatus* until now (for instance, Sanchiz *et al.* 2002). The species was referred to as *Pelodytes* sp. by Crespo *et al.* (2008) and van de Vliet *et al.* (2012) and as lineage A in Díaz-Rodríguez *et al.* (2015).

Diagnosis. – Assigned to the genus *Pelodytes* based on high morphological similarity to *P. punctatus*, the type species of the genus; vertical pupil; network of dark lines in the skin of tadpoles; tadpoles with sinistral spiraculum; and molecular phylogenetic relationships. Of similar size as *P. ibericus*; mean SVL 31.4 mm (maximum 39.2 mm) in males, 34.7 mm (40.4 mm) in females. Morphologically similar to the other three western *Pelodytes* species, but distinguished from *P. hespericus* sp. nov. and *P. punctatus* by smaller body size (Table 3; Fig. 6), from *P. ibericus* by longer limbs and fewer **B** notes in advertisement calls (Figs. 6-7), and from *P. hespericus* sp. nov. by more **B** notes in advertisement calls (Fig. 7). Furthermore, distinguished from all other *Pelodytes* species by concordant differences in mtDNA and nDNA sequences.

Holotype. – EBD 34645 (GLA03-JDR2015), adult male collected by Jesús Díaz-Rodríguez on 29 January 2015 at Mindelo Ornithological Reserve, Mindelo, Porto, Portugal. Geo. coord: 41.318539°, -8.737131°.

Paratypes. – EBD 34646 (GLA01-JDR 2015) and EBD 34647 (GLA02-JDR 2015), adult males collected on 29 January 2015 by same collector and at same locality as holotype. ZSM 1/2011 collected from Nives, north of Portimão; ZSM 1201/2012, collected from Barão de São Miguel; ZSM 194/2016, male specimen collected near Vila do Bispo, Portugal; and vouchers from Lisbon Natural Museum, collected on 1983 by E.G. Crespo: MB 110 collected on 1983 by E.G. Crespo from Cacém; twelve specimens from the series MB 112, collected on 21 October 1982 by E.G. Crespo from Cascais; and ten specimens from the series MB 113 collected on 27 October 1987 by E.G. Crespo at Benfica.

Etymology. – *atlanticus* is a genitive adjective derived from the name of Titan Atlas who, according to the ancient greek mythology, lived beyond the strait of Gibraltar and refers to the species' exclusive distribution along the Atlantic coast of Portugal.

Description of the holotype. – Adult male in excellent state of preservation. Some tissue removed ventrally from right thigh for molecular analysis. Measurements: SVL, 33.0; HW, 11.6; HL, 11.0; TD, 1.9; ED, 3.6; END, 2.7; NSD, 2.6; NND, 2.3; HAL, 9.0; FORL, 20.0; HIL, 52.6; FOL, 16.6;

FOTL, 25.4; TIL, 16.5. Body relatively slender; head dorsally flattened, slightly wider than longer, wider than body; snout slightly pointed in dorsal view, rounded and flattened in lateral view; nostrils directed dorsolaterally, slightly protuberant, nearer to tip of snout than to eye; canthus rostralis indistinct, straight; loreal region very slightly concave, almost flat; eye moderately large, notably protuberant dorsally; interocular distance slightly larger than horizontal eye diameter, larger than internarial and eye-nostril distance; pupil vertical; tympanum externally visible, distinct, oval, wider vertically than horizontally, its horizontal diameter being 68% of vertical eye diameter, positioned near corner of mouth; supratympanic fold distinct in its anterodorsal part running from posterior corner of eye to level of forelimb insertion; tongue free posteriorly, of truncated shape, vomerine teeth distinct, in two patches between and at the same level as choanae; choanae moderately sized, ovoid. Premaxillary and maxillary teeth present. Arms slender, webbing almost absent, very small rudiments recognizable; comparative finger length $I < II < IV < III$, fingers with dermal fringes. No enlarged finger disks. One large, conical subarticular tubercle present proximally on each finger; three flattened metacarpal tubercles; inner and outer metacarpal tubercles of different size (outer slightly larger than inner) and distinctly larger than central tubercle. Black nuptial pads on inner sides of first and second fingers, as one elongate patch on forearm, a second slightly bigger elongate patch on arm, and a small agglomeration on both sides of chest near axilla. Hindlimbs slender; tibiotarsal articulation reaches between eye and nostril when adpressed along body; inner metatarsal tubercle distinct but relatively small, outer metatarsal tubercle absent; proximal subarticular tubercles indistinct, remaining subarticular tubercles absent. Comparative toe length $I < II < V < III < IV$; third toe distinctly longer than fifth toe; toes with conspicuous dermal fringes to tip. Webbing between toes weakly expressed but clearly present and more than merely an extension of dermal fringes. Webbing formula difficult to determine due to absence of subarticular tubercles and presence of dermal fringes.

Skin on the dorsal surface granular, with distinct warts; skin of throat, chest, and venter smooth except granular on posterior most part of belly; ventral surfaces of thighs and arms granular. Especially those warts that coincide with dark greenish spots on dorsum of slightly elongated shape and arranged in longitudinal rows. The anterodorsal part of supratympanic fold is continued into the inguinal region as a distinct row of small tubercles and ridges.

Colour of the holotype: The skin colour is between dark gray to olive brown with drab green bands on the back and legs. The back is dotted with small round or oval prominences of olive colors. The ventral area, which is smooth or slightly rough, has a light colour from pale green to gray tones. Nuptial pads are grass green. Colour in life (Fig. 11) is more clear with light greenish spots on the back and a design of a drab olive line from the eye to the insertion of anterior legs.

Distribution. – *Pelodytes atlanticus* is restricted to Portugal, comprising the central-eastern part of the country (Alto Alentejo), and coastal areas from Faro to Sagres in the Algarve, and from Cape of

São Vicente to Cavado River, Esposende (Crespo *et al.* 2008; Matos *et al.* 2010). The ecological range is similar to that of *P. ibericus* with hybrids occurring in a long and narrow contact zone between this species and *P. atlanticus* (van de Vliet *et al.* 2012; Díaz-Rodríguez *et al.* 2015).

Natural history. – Poorly known. Reproductive phenology is similar to *P. ibericus* and takes place early in the season, starting with the first rains at mid-autumn and extending into the winter. More detailed fieldwork is needed to determine the conservation status of populations in some regions (van de Vliet *et al.* 2012; Nunes *et al.* 2014). Given that suitable breeding habitats (i.e., temporary ponds in traditional Mediterranean farmland) are disappearing at an alarming rate in Portugal (Beja & Alcazar 2003) affecting overall Mediterranean biodiversity (Stoate *et al.* 2009), it is urgent to assess the conservation status of this species and possibly implement conservation measures. In the Natural Reserve of Paul do Boquilobo (central Portugal), the introduction of the American crayfish (*Procambarus clarkii*) resulted in the extinction of local populations of *P. atlanticus* eight years later (Cruz *et al.* 2008).

Advertisement call and reproductive behavior. – The call is similar to that of other western *Pelodytes* lineages, consisting of two types of notes (**A** and **B**). The number of **B** notes in a call is on average lower than in *P. ibericus*, but higher than in *P. hespericus* sp. nov. (Fig. 7). Pargana (1998) found differences in call variables between Portuguese populations of *P. atlanticus* sp. nov. from Lisboa, Alto Alentejo and Algarve, versus populations of *P. ibericus* from Baixo Alentejo and east Algarve. As with *P. hespericus* sp. nov., call parameters were not related to the size or age of the male.

Tadpole. – We assessed morphological data in one tadpole in developmental stage 37 (field number ZCMV 14042 from Vila do Bispo, BL 25.9 mm, TL 49.4 mm). The external morphology of this tadpole and one other specimen has a close similarity to those of *P. punctatus*, except the LTRF 4(2-4)/4(1-2) and 4(3-4)/5(1-3) (Fig. 9c).

4.4. *Pelodytes hespericus* sp. nov.

(Fig. 12)

Identity and Diagnosis. – Populations of this species have been considered as *P. punctatus* by Sánchez-Herráiz *et al.* (2000), and as lineage C by Díaz-Rodríguez *et al.* (2015). Assigned to the genus *Pelodytes* based on high morphological similarity to *P. punctatus*, the type species of the genus; vertical pupil; network of dark lines in the skin of tadpoles; tadpoles with sinistral spiraculum; and molecular phylogenetic relationships. Of similar size as *P. punctatus*; mean SVL 35.3 mm (maximum

39.0 mm) in males, 39.8 mm (43.3 mm) in females. Morphologically similar to the other three western *Pelodytes* species, but distinguished from all of them by no repetitions of **B** notes in advertisement calls according to the recordings analyzed herein (Fig. 7), from *P. ibericus* by longer limbs and larger body size, and from *P. atlanticus* sp. nov. by larger body size (Fig. 6; Table 3). Furthermore, it is distinguished from all other *Pelodytes* species by concordant differences in mtDNA and nDNA sequences.

Holotype. – EBD 34505 (JDR 2012-1), adult male collected by Jesús Díaz-Rodríguez on 9 April 2012 at Artunido (Casas de Carrasco), Sierra de Segura, Jaén province, Spain. Geo. coord: 38.119349°, -2.691951°.

Paratypes. – EBD 34506 (JDR 2012-2), adult male, and EBD 34507 (JDR 2012-3), adult female, collected on 8 April 2012 by same collector and at same locality as holotype. Individuals deposited in Doñana Biological Station with numbers EBD 28169, 28170, 28171, 28172, 28173, 28174, 28175 collected from Soria; EBD 20440 collected from Huesca, EBD 33728 and EBD 26828 collected from Almería; and specimens deposited in National Museum of Natural Sciences with the numbers MNCN 667, MNCN 669, MNCN 670, MNCN 672, MNCN 673, MNCN 684, MNCN 686, MNCN 2720, MNCN 2721, MNCN 2722, MNCN 2723, MNCN 2724, MNCN 2725 collected from Valencia; MNCN 689 collected from Ciempozuelos (Madrid); MNCN 25023, MNCN 25024, MNCN 25025, MNCN 25026, MNCN 25027, MNCN 25028, MNCN 25029, MNCN 25032, MNCN 25033, MNCN 25034, MNCN 25035, MNCN 25036 collected from La Rioja; MNCN 41414, MNCN 41416 collected from Masa (Burgos) and MNCN 24489, MNCN 24490 from Merindad del Río Ubierna (Burgos); MNCN 25020 from Teruel, MNCN 25021, MNCN 25037 from Zaragoza, MNCN 41697 from Brea de Tajo (Madrid), MNCN 41698 from Corpa (Madrid), MNCN 377 from Almodóvar del Campo (Ciudad Real); MNCN 25022 collected from Palencia and MNCN 20783 collected from Castellón.

Etymology. – The specific name is a latinized adjective derived from the name *Hesperides* (*Ἑσπερίδες*), Nymphs of the fading sun and daughters of the Titan Atlas, in allusion to an Iberian mythological garden. The Hesperian Massif also takes its name from the same etymology, meaning “western” in ancient greek, referring to its position in the Mediterranean sea.

Description of the holotype. – Adult male in excellent state of preservation. Some tissue removed ventrally from right thigh for molecular analysis. Measurements: SVL, 36.6; HW, 12.7; HL, 13.3; TD, 2.7; ED, 4.0; END, 4.3; NSD, 3.0; NND, 3.6; HAL, 10.6; FORL, 23.2; HIL, 61.6; FOL, 18.4; FOTL, 28.5; TIL, 18.4. Body relatively slender; head dorsally flattened, slightly longer than wide, wider than body; snout slightly pointed in dorsal view, rounded in lateral view; nostrils directed dorsolaterally, not protuberant, nearer to tip of snout than to eye; canthus rostralis indistinct, straight; loreal region very slightly concave, almost flat; eye moderately large, notably protuberant dorsally;

interocular distance slightly smaller than horizontal eye diameter, larger than internarial and slightly smaller than eye-nostril distance; pupil vertical; tympanum externally visible, distinct, oval, wider vertically than horizontally, its horizontal diameter is 68% of maximum eye diameter, positioned near corner of mouth; supratympanic fold moderately distinct in its anterodorsal part running from posterior corner of eye to posterior corner of tympanum, indistinct in its posteroventral part running from posterior corner of tympanum to insertion of forelimb; tongue free posteriorly, of truncate shape, vomerine teeth distinct, in two patches between and at the same level as choanae; choanae moderately sized, ovoid. Premaxillary and maxillary teeth present. Arms slender, webbing almost absent, very small rudiments recognizable; comparative finger length $I < II < IV < III$, fingers with dermal fringes (poorly recognizable on small fingers due to fixation). No enlarged finger disks. One large, rounded subarticular tubercle present proximally on each finger; three flattened metacarpal tubercles; inner and outer metacarpal tubercles of similar size and distinctly larger than central tubercle. Black nuptial pads on inner sides of first and second fingers, as one elongate patch on forearm, a second slightly smaller elongate patch on arm, and a small agglomeration on both sides of chest near axilla. Hindlimbs slender; tibiotarsal articulation reaches between eye and nostril when adpressed along body; inner metatarsal tubercle distinct but relatively small, outer metatarsal tubercle absent; proximal subarticular tubercles indistinct, remaining subarticular tubercles absent. Comparative toe length $I < II < V < III < IV$; third toe distinctly longer than fifth toe; toes with conspicuous dermal fringes to tip. Webbing between toes weakly expressed but clearly present and more than merely an extension of dermal fringes. Webbing formula difficult to determine due to absence of subarticular tubercles and presence of dermal fringes, but webbing almost complete between toes I and II, between second and third phalangeal joint of toe II between toes II and III. Skin on the dorsal surface granular, with distinct warts; skin of throat, chest, and venter smooth except granular on posteriormost part of belly; ventral surfaces of thighs and arms granular. Especially those warts that coincide with dark greenish spots on dorsum of slightly elongated shape and arranged in longitudinal rows. The anterodorsal part of the supratympanic fold is continued into the inguinal region as a distinct row of small tubercles and ridges, partly marked by greenish dots.

Colour of the holotype. The skin colour is between dark green to olive drab with light olive bands on the back and legs. The back is dotted with a pattern of small oval and linear prominences of olive green. On the lateral side, a clear band is more or less visible, from the tympanum to the insertion of posterior limbs. The ventral area, which is smooth or slightly rough, has a light colour from pale green to yellow tones. Colour in life is similar, with light greenish spots on the back, instead of drab colors, and a design of two crossed bands clear without dots (Fig. 12).

Variation. – In the paratypes EBD 34506 and EBD 34507, the foot webbing is much less distinctly expressed.

Distribution. – *Pelodytes hespericus* is distributed in the Iberian Peninsula and as far as known, restricted to Spain. Its range extends mainly in areas of low and mid-altitude mountains, from the sea level to 1,900 m in La Rioja (Zaldívar 2004), almost 2,000 m in Sierra Seca (Granada) and maybe higher at the locality of Castril, Granada (Fernández-Cardenete *et al.* 2000), but additional confirmation is required. It occupies most of the eastern and central parts of Spain (Lacomba & Sancho 1999; Barbadillo 2002b). The western range limits are in the southeast of Madrid (Martínez-Solano & García-París 2001; Martínez-Solano 2006), in the provinces of León and Zamora, and in the Montes de Toledo in Toledo and Ciudad Real. Southwards the species reaches the northern parts of Jaén and Granada provinces (Barbadillo 2002b; Ceacero *et al.* 2007) and coastal parts of Almería (González-Miras & Nevado 2008; Díaz-Rodríguez *et al.* 2015).

Natural history. – Lizana *et al.* (1986) and Esteban *et al.* (2004) provided notes on the natural history of this species. *Pelodytes hespericus* is a generalist that tolerates a wide range of climatic conditions and diverse substrates. However, it seems to avoid siliceous and some types of acid soils (Sánchez-Herráiz 2004). It can be found in semi-arid steppes in the Ebro basin and the southeast, as well as in temperate forests of beech and oak, but usually avoids the densest forest formations. It is common in abandoned quarries and cattle ponds and tolerates high levels of salinity. Specimens can reach eight years (males) and 10 years (females) of age (Esteban *et al.* 2004; Sánchez-Herráiz 2004).

Advertisement call and reproductive behavior. – The call is similar to that of other western *Pelodytes* lineages, consisting of two types of notes (**A** and **B**). In the recordings previously studied by Sánchez-Herráiz (2004) analyzed by us, and in numerous other individuals heard in the field, one call typically consists of one **A** note followed by a single **B** note (Fig. 7). Reciprocal calls of females have been reported (Sánchez-Herráiz 2004). Calling specimens are found at the edge or within water, with body temperatures between 10 °C -17.5°C (Sánchez-Herráiz 2004; Esteban *et al.* 2002). Call intensity and spectral frequency were not found to be related to the size or age of the male (Esteban *et al.* 2002).

Acknowledgments

We thank the editor and five anonymous reviewers for feedback on a previous draft. For technical support during lab work we thank Meike Kondermann, Ana Piriz, J. M. Gasent, and all members of lab team of LEM (Molecular Ecology Laboratory) in Doñana Biological Station, Seville. We thank E. Albert, F. Amat, J.W. Arntzen, J. A. M. Barnestein, D. Canestrelli, M.A. Carretero, F. Ceacero, A. Cordero, T. Couturier, P. A. Crochet, D. Donaire, H. Duarte, B. Estanque, L. García Cardenete, P. Geniez, E. Gomes, J.P. González de la Vega, M. Jowers, M. Katzenberger, A. Montori, N. Oromí, R. Rebelo, M. A. Romeo Lafuente, A. Sánchez, G. Schreur, J. Teixeira and W. de Vries for providing photos, samples or help during collection and fieldwork. R.D. Randrianiaina assisted with the tadpole descriptions. We also thank E. Matheu, Richard G. Bowker and A. González (Fonoteca Zoológica) for sharing recordings and especially M. Domínguez and L. Ceriáco for support at National Museum of Natural History, Madrid (MNCN) in Spain and Museu Nacional de História Natural e da

Ciência, Lisboa (MUHNAC) in Portugal. W. Böhme (ZFMK), F. Glaw and M. Franzen (ZSM), Annemarie Ohler (MNHN), and J.M. Padial and S.D. Busack (CM) allowed examination of specimens held under their care. Special thanks also to contributions of Glenda and Graçaliz Dimuro for the comprehensive reading and design of this manuscript. Partial funding for acoustical analyses, sound editing and storage was provided by Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, projects TATANKA CGL2011-25062, CGL2010-09700 and ACOURA CGL2008-04814 and Ministerio de Economía y Competitividad, Spain project CGL2011-16159-E. This work was supported through Project CGL2012-40246-C02-01 28300 (Ministerio de Economía y Competitividad Subdirección General de Proyectos de Investigación Dpto. Técnico de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Spain) to MT; Project “Genomics and Evolutionary Biology” co-financed by North Portugal Regional Operational Programme 2007/2013 (ON.2 – O Novo Norte), under the National Strategic Reference Framework (NSRF), through the European Regional Development Fund (ERDF); by FEDER funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and by National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology PTDC/BIA-BEC/099915/2008 and FCOMP-01-0124-FEDER-008915 to HG. JDR was supported by a PhD grant from FCT (SFRH/BD/70631/2010) and CGL2005-02931/BOS (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). IMS and HG are currently supported by funding from the Spanish Severo Ochoa Program (SEV-2012-0262) and by a postdoctoral grant from FCT (SFRH/BPD/102966/2014), respectively. Additional funds were provided by grants: “Anfibios Endémicos de Andalucía” (Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Spain) to MT.

References

- Abellán, P. & Svenning, J.C. (2014) Refugia within refugia—patterns in endemism and genetic divergence are linked to Late Quaternary climate stability in the Iberian Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113, 13–28.
- Andreone, F. & Sindaco, R. (1998) *Erpetologia del Piemonte e della Valle d'Aosta. Atlante degli Anfibi e dei Rettili*. Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, 283 pp.
- Arévalo, E., Davis, S. K., & Sites, J. W. (1994) Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Systematic Biology*, 43, 387–418.
- Arnold, N., Burton, J.A. & Ovenden, D.W. (1978) *A Field Guide to Reptiles and Amphibians of Britain and Europe*. Harper Collins, London, 272 pp.
- Arntzen, J. W., Jehle, R., Bardakci, F., Burke, T., & Wallis, G. P. (2009) Asymmetric viability of reciprocal-cross hybrids between crested and marbled newts (*Triturus cristatus* and *T. marmoratus*). *Evolution*, 63, 1191–1202.
- Avilés, J. M., Parejo, D. & Lavado, F. (1999) Análisis mediante escuchas de la distribución de *Pelodytes punctatus* en la provincia de Badajoz. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 10, 14–16.
- Ayllón E., Bustamante P., Cabrera F., Flox L., Galindo A. J., Gosálvez R. U., Hernández J. M., Morales M., Torralvo C. & Zamora, F. (2003) Preliminary distribution atlas of the amphibians and reptiles of Ciudad Real province (Castilla-La Mancha, Spain). *Zoologica Baetica*, 13/14, 155–202.
- Babik, W., Szymura, J.M. & Rafinski, J. (2003) Nuclear markers, mitochondrial DNA, and male secondary sexual traits variation in a newt hybrid zone (*Triturus vulgaris* x *T. montandoni*). *Molecular Ecology*, 12, 1913–1930.
- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. (2004) The incomplete natural history of the mitochondria. *Molecular Ecology*, 13, 729–744.
- Barbadillo, L. J., Lacomba, J. I., Pérez-Mellado, V., Sancho, V., López-Jurado, L. F. (1999) *Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias*. Editorial GeoPlaneta, Barcelona, 419 pp.
- Barbadillo, L. J. (2002a) *Pelodytes ibericus*. In: Pleguezuelos, J. M., Márquez, R. & Lizana, M. (Eds.), *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid, pp. 97–99.
- Barbadillo, L. J. (2002b) *Pelodytes punctatus*. In: Pleguezuelos, J. M., Márquez, R. & Lizana, M. (Eds.), *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid, pp. 100–102.
- Barley, A.J., White, J., Diesmos, A.C. & Brown, R.M. (2013) The challenge of species delimitation at the extremes: diversification without morphological change in Philippine sun skinks. *Evolution*, 67, 3556–3572.
- Barrow, L.N., Ralicki, H.F., Emme, S.A. & Lemmon, E.M. (2014) Species tree estimation of North American chorus frogs (Hylidae: *Pseudacris*) with parallel tagged amplicon sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75, 78–90.
- Bea, A., Montori, A. & Pascual, X. (1994) Herpetofauna dels Aiguamolls de l'Empordà. In: Gosálbez, J. (Ed.), *Els sistemes naturals dels Aiguamolls de l'Empordà*. Treballs de la Institució Catalana d'Història Natural, 13, Barcelona, pp. 359–407.
- Beja, P. & Alcazar, R. (2003) Conservation of Mediterranean temporary ponds under agricultural intensification: an evaluation using amphibians. *Biological Conservation*, 114, 317–326.

- Bickford, D., Lohman, D., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. & Das, I. (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 148–155.
- Blain, H.A. (2009) Contribution de la paléoherpétofaune (Amphibia & Squamata) à la connaissance de l'évolution du climat et du paysage du Pliocène supérieur au Pléistocène moyen d'Espagne. *Treballs del Museu de Geologia de Barcelona*, 16, 39–170.
- Blain, H.A. & Bailón, S. (2003) Les amphibiens et les reptiles des couches du Pléistocène supérieur ancien du gisement d'Artenac (Charente, France). *Quaternaire*, 14, 85–95.
- Blain, H.A., Bailón, S. & Agustí, J. (2008a) Amphibians and squamate reptiles from the latest early Pleistocene of Cueva Victoria (Murcia, southeastern Spain, SW Mediterranean): paleobiogeographic and paleoclimatic implications. *Geologica Acta*, 6, 345–361.
- Blain, H.A., Bailón, S. & Cuenca-Bescós, G. (2008b) The Early-Middle Pleistocene palaeoenvironmental change based on the squamate reptile and amphibian proxies at the Gran Dolina site, Atapuerca, Spain. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 261, 177–192.
- Blain, H.A., Bailón, S., Cuenca-Bescós, G., Arsuaga, J. L., Bermúdez de Castro, J. M. & Carbonell, E. (2009) Long-term climate record inferred from early-middle Pleistocene amphibian and squamate reptile assemblages at the Gran Dolina Cave, Atapuerca, Spain. *Journal of Human Evolution*, 56, 55–65.
- Blain, H.A., López-García, J.M., Cordy, J.M., Pirson, S., Abrams, G., Di Modica, K.M. & Bonjean, D. (2014) New contribution to the study of the small-vertebrate assemblages of Seladina cave (late Pleistocene, province of Namur, Belgium). In: *Middle Palaeolithic in North-West Europe: Multidisciplinary Approaches. Middle Paleolithic Conference, Moulins de Beez*.
- Böhme, M. & Ilg, A. (2003) fosFARbase, <www.wahre-staerke.com/> (accessed 1 November 2015).
- Boix, D., Sala, J., Quintana, X.D. & Moreno-Amich, R. (2004) Succession of the animal community in a Mediterranean temporary pond. *Journal of the North American Benthological Society*, 23, 29–49.
- Bonaparte, C. L. J. L. (1838) *Iconographia della Fauna Italica per le Quattro Classi degli Animali Vertebrati. Tomo II. Amphibi. Fascicolo 23*. Salviucci, Rome.
- Borrás, S. & Polls, M. (1987) Los reptiles del prepirineo oriental (Cadí-Moixeró y La Cerdaña) y biogeografía de la herpetofauna de la zona. *Miscellània Zoològica*, 11, 309–318.
- Bosch, J., Tejedo, M., Lizana, M., Beja, P., Martínez-Solano, I., Salvador, A., García-París, M., Recuero Gil, E., Márquez, R., Díaz Paniagua, C. & Pérez-Mellado, V. (2009) *Pelodytes ibericus*. In: *The IUCN Red List of Threatened Species e.T58055A11724130. Version 2015-3* <www.iucnredlist.org> (accessed 1 November 2015).
- Boulenger, G. A. (1896) Descriptions of new batrachians in the British Museum. *Annals and Magazine of Natural History, Series 6*, 17, 401–406.
- Boulenger, G.A. (1897) The tailless batrachians of Europe-Part I. *Ray Society*, London.
- Busack, S.D. (1977) Zoogeography of amphibians and reptiles in Cadiz province, Spain. *Annals of the Carnegie Museum*, 46, 285–316.
- Busack, S. D. & Jaksic, F. M. (1982) Ecological and historical correlates of Iberian herpetofaunal diversity: an analysis at regional and local levels. *Journal of Biogeography*, 9, 289–302.
- Camargo, A. & Sites Jr., J. (2013) Species delimitation: A decade after the renaissance. In: Pavlinov, I. (Ed.), *The Species Problem - Ongoing Issues*. InTech, DOI: 10.5772/52664.
- Cardellini, P. & Sala, M. (1987) Hemoglobin transition in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 86, 85–89.
- Carstens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M. & Satler, J.D. (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22, 4369–4383.
- Cayuela, H., Besnard, A., Bechet, A., Devictor, V. & Olivier, A. (2012) Reproductive dynamics of three amphibian species in Mediterranean wetlands: the role of local precipitation and hydrological regimes. *Freshwater Biology*, 57, 2629–2640.
- Ceacero, F., García-Muñoz, E., Pedrajas, L., Hidalgo, A. & Guerrero, F. (2007) Actualización herpetológica de la provincia de Jaén. Pp. 130-139. In: Gosá, A., Egaña-Callejo, A. & Rubio, X. (Eds.), *Herpetología iberiarraren egoera = Estado actual da Herpetología Ibérica = Estado actual de la Herpetología Ibérica: Lehen Herpetologia Kongressua Euskal Herrian, IX Congressus Luso-Espanhol, XIII Congreso Español de Herpetología. Munibe. Suplemento*, 25. Aranzadi Zientzi Elkartea, Donostia, 303 pp.
- Colliard, C., Sicilia, A., Turrisi, G.F., Arculeo, M., Perrin, N., Stöck, M. (2010) Strong reproductive barriers in a narrow hybrid zone of West-Mediterranean green toads (*Bufo viridis* subgroup) with Plio-Pleistocene divergence. *BMC Evolutionary Biology* 10, 232.
- Crespo, E. G., Márquez, R., Pargana, J. & Tejedo, M. (2008) *Pelodytes* spp. Bonaparte, 1838. In: Loureiro, A., Ferrand de Almeida, N., Carretero, M. A. & Paulo, O. S. (Eds.), *Atlas dos Anfíbios e Répteis de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, Lisboa, pp. 112-115.
- Crespo, E. G. & Oliveira, M.E. (1989) *Atlas da Distribuição dos Anfíbios e Répteis de Portugal Continental*. Serviço Nacional de Parques Reservas e Conservação da Natureza, Lisboa, 98 pp.
- Cruz, M. J., Segurado, P., Sousa, M. & Rebelo, R. (2008) Collapse of the amphibian community of the Paul do Boquilobo Natural Reserve (central Portugal) after the arrival of the exotic American crayfish *Procambarus clarkii*. *Herpetological Journal*, 18, 197–204.
- Darevsky, I. S., Drozdov, N. N. & Orlova, V. F. (1971) The new data about geographic distribution of the Caucasian parsley frog—*Pelodytes caucasicus* Boulenger (Amphibia, Salientia). *Vestn. Zool*, 3, 77–78.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Da Silva, E. (1994) Contribución al Atlas herpetológico de la provincia de Badajoz I. Anfíbios. *Revista Española de Herpetología*, 8, 87-94.
- Daudin, F.-M. (1802) *Histoire Naturelle des Rainettes, des Grenouilles et des Crapauds. Quarto version*. Levrault, Paris, 108 pp.
- Dayrat, B. (2005) Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407–415.

- Degnan, J.H. & Rosenberg, N.A. (2009) Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology and Evolution*, 24, 332–340.
- Delfino, M. (2002) *Erpetofauna italiana el Neogene e del Cuaternario*. Tesi di Dottorato, Università degli Studi di Modena e Regio Emilia, Modena, 382 pp.
- Delfino, M. (2004) The Middle Pleistocene herpetofauna of Valdemino cave (Liguria, North-Western Italy). *Herpetological Journal*, 14, 113–128.
- Denoël, M., Beja, P., Andreone, F., Bosch, J., Miaud, C., Tejado, M., Lizana, M., Martínez-Solano, I., Salvador, A., García-París, M., Recuero Gil, E., Marquez, R., Cheylan, M., Díaz Paniagua, C. & Pérez-Mellado, V., (2009) *Pelodytes punctatus*. In: *IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-3*. <www.iucnredlist.org>. (accessed 1 November 2015).
- de Queiroz, K. (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard, D.J. & Berlocher, S.H. (Eds.), *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, New York, pp 57–75.
- de Queiroz, K. (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886.
- Devitt, T. J., Baird, S. J., & Moritz, C. (2011) Asymmetric reproductive isolation between terminal forms of the salamander ring species *Ensatina eschscholtzii* revealed by fine-scale genetic analysis of a hybrid zone. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 245.
- Díaz Paniagua, C. (1983) Influencia de las características del medio acuático sobre las poblaciones de larvas de anfibios en la Reserva Biológica de Doñana (Huelva, España). *Doñana, Acta Vertebrata*, 10, 41–53.
- Díaz Paniagua, C. (1986) Reproductive period of amphibians in the Biological Reserve of Doñana (SW Spain). In: Roček, Z. (Ed.), *Studies in herpetology*. Charles University, Prague, pp 429–432.
- Díaz Paniagua, C. (1988) Temporal segregation in larval amphibian communities in temporal ponds at a locality in SW Spain. *Amphibia-Reptilia*, 9, 15–26.
- Díaz-Paniagua, C. (1989) Larval diets of two anuran species, *Pelodytes punctatus* and *Bufo bufo*, in SW Spain. *Amphibia-Reptilia*, 10, 71–75.
- Díaz-Paniagua, C. (1990) Temporary ponds as breeding sites of amphibians at a locality in Southwestern Spain. *Herpetological Journal*, 11, 447–453.
- Díaz-Paniagua, C., & Rivas C.R. (1987) Datos sobre actividad de anfibios y pequeños reptiles de Doñana (Huelva, España). *Mediterránea. Serie de Estudios Biológicos*, 9, 15–27.
- Díaz-Paniagua, C., Gómez-Rodríguez, C., Portheault, A. & de Vries, W. (2005) *Los anfibios de Doñana*. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid, 181 pp.
- Díaz-Rodríguez, J., Gonçalves, H., Sequeira, F., Sousa-Neves, T., Tejado, M., Ferrand, N. & Martínez-Solano, I. (2015) Molecular evidence for cryptic candidate species in Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 224–241.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. (1986) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York, 670 pp.
- Duguet, R. & Melki, F. (Eds.) (2003) *Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*. Biotope Éditions, Mèze, 480 pp.
- Earl, D.A. & von Holdt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361.
- Egea-Serrano, A., Oliva-Paterna, F. J. & Torralva, M. (2005) Fenología reproductiva de la comunidad de anfibios del Noroeste de la Región de Murcia (SE Península Ibérica). *Zoologia Baetica*, 16, 59–72.
- Elzen, P. V. (1975) Contribution a la connaissance de *Pelodytes punctatus* Daudin (1802) (Amphibia, Pelobatidae), étudié en Camargue. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 100, 691–692.
- Elzen, P. V. (1976) Remarques sur la biologie de *Pelodytes punctatus* Daudin 1802 (Amphibia, Pelobatidae) en Camargue. *Revue Française d'Aquariologie*, 3, 99–104.
- Erişmiş, U.C., Arıkan, H., Konuk, M. & Guarino, F.M. (2011) Age structure and growth in Caucasian parsley frog *Pelodytes caucasicus* (Boulenger, 1896) from Turkey. *Russian Journal of Herpetology*, 16, 19–26.
- Escoriza, D. & Ruhí, A. (2014) Macroecological patterns of amphibian assemblages in the Western Palearctic: Implications for conservation. *Biological Conservation*, 176, 252–261.
- Escoriza, D. (2015) Sapillo moteado – *Pelodytes punctatus*. In: Salvador, A., Martínez-Solano, I. (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <<http://www.vertebradosibericos.org/>> (accessed 1 Noviembre 2015).
- Esteban, M., Sánchez-Herráiz, M. J., Barbadillo, L. J., Castanet, J. & Márquez, R. (2002) Effects of age, size and temperature on the advertisement calls of two Spanish populations of *Pelodytes punctatus*. *Amphibia-Reptilia*, 23, 249–258.
- Esteban, M., Sánchez-Herráiz, M. J., Barbadillo, L. J. & Castanet, J. (2004) Age structure and growth in an isolated population of *Pelodytes punctatus* in northern Spain. *Journal of Natural History*, 38, 2789–2801.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- Fernández-Cardenete, J.R., Luzón-Ortega, J.M., Pérez-Contreras, J. & Tierno de Figueroa, J.M. (2000) Revisión de la distribución y conservación de los anfibios y reptiles en la provincia de Granada (España). *Zoologica Baetica*, 11, 77–104.
- Folmer, O.M., Black, W., Hoeh, Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biotechnology*, 3, 294–299.
- Ford, L.S. & Cannatella, D.C. (1993) The major clades of frogs. *Herpetological Monographs*, 7, 94–117.

- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. & Gemmell, N.J. (2007) Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE*, 2, e1109.
- Franco, A. & Rodríguez de los Santos, M. (Eds.) (2001) *Libro Rojo de los Vertebrados Amenazados de Andalucía*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla, 336 pp.
- Frost, D.R. (2015) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 Electronic Database accessible at <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> (accessed 1 November 2015). American Museum of Natural History, New York.
- Funk, W.C., Caminer, M. & Ron, S.R. (2012) High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279, 1806–1814.
- García-Muñoz, E., Guerrero, F., Bicho, R.C. & Parra, G. (2011) Effects of ammonium nitrate on larval survival and growth of four Iberian amphibians. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87, 16–20.
- García-París, M., Buchholz, D.R. & Parra-Olea, G. (2003) Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28, 12–23.
- Garriga, N. & Llorente, G.A. (2011) Chondrocranial ontogeny of *Pelodytes punctatus* (Anura: Pelodytidae). Response to competition: geometric morphometric and allometric change analysis. *Acta Zoologica*, 93, 453–464.
- Gerhardt, H. C. (1991) Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour*, 42, 615–635.
- Gómez, A. & Lunt, D. (2007) Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. Pp. 155–188 in: Weiss, S. & Ferrand, N. (Eds.): *Phylogeography in Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity*. Dordrecht: Springer
- González de la Vega, J.P. (1988) *Anfibios y reptiles de la provincia de Huelva*. *Ertisa*, Huelva, 121 pp.
- González-Miras, E. & Nevado, J.C. (2008) Atlas de distribución de los anfibios de la provincia de Almería (sudeste ibérico, España) *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 19, 85–90.
- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S. & Bonatto, S.L. (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 15, 3969–3982.
- Guixé, D., Maluquer, J. & Camprodon, J. (2009) Rècord altitudinal de *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1802) a Catalunya i a la península Ibèrica. *Bulletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, 18, 71–73.
- Guyétant, R. (1986) Les amphibiens de France. *Revue Française d'Aquariologie et Herpetologie*, 1975, 24–28.
- Guyétant, R. & Geniez, P. (2013) *Pelodytes punctatus*. In: Lescure, J. & de Massary, J. C. (Eds.), *Atlas des Amphibiens et Reptiles de France*. Biotope Éditions-MNHN, Mèze, pp. 104–105.
- Guyétant, R., Temmermans, W. & Avriillier, J. N. (1999) Phénologie de la reproduction chez *Pelodytes punctatus* Daudin, 1802 (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia*, 20, 149–160.
- Guyétant, R. (2004) *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1803). In: Gasc, J. P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J. P., Maurin, H., Oliveira, M. E., Sofianidou, T. S., Veith, M. & Zuiderwijk, A. (Eds.) *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*. Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire Naturelle, Paris, pp. 116–117.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hauswaldt, J. S., Ludewig, A.-K., Vences, M. & Pröhl, H. (2011) Widespread co-occurrence of divergent mitochondrial haplotype lineages in a Central American species of poison frog (*Oophaga pumilio*). *Journal of Biogeography*, 38, 711–726.
- Hawlikschek, O., Nagy, Z.T. & Glaw, F. (2012) Island evolution and systematic revision of Comoran snakes: why and when subspecies still make sense. *PLoS ONE*, 7, e42970.
- Heled, J. & Drummond, A. J. (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 570–580.
- Hoegg, S., Vences, M., Brinkmann, H. & Meyer, A. (2004) Phylogeny and comparative substitution rates of frogs inferred from three nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 1188–1200.
- Holman, J.A. (1998) *Pleistocene Amphibians and Reptiles in Britain and Europe*. *Oxford Monographs on Geology and Geophysics*, 38. Oxford University Press, New York, 254 pp.
- Hotz, H. (1971) Analyse des Paarungsrufes von *Pelodytes punctatus* (Daudin 1803) (Amphibia, Pelobatidae). *Experientia*, 27, 851–852.
- Huson, D.H. & Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 254–267.
- İğci, N., Akman, B., Göçmen, B., Adakul, A., & Oğuz, M.A. (2013) A new locality record of Caucasian parsley frog, *Pelodytes caucasicus* Boulenger, 1896 (Amphibia: Anura: Pelodytidae) in the eastern Black Sea region of Anatolia. *Biharean Biologist*, 7, 54–56.
- Irisarri, I., San Mauro, D., Abascal, F., Ohler, A., Vences, M. & Zardoya, R. (2012) The origin of modern frogs (Neobatrachia) was accompanied by acceleration in mitochondrial and nuclear substitution rates. *BMC Genomics*, 13, e626.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. & Wilson A.C. (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular and Evolution*, 32, 128–144.
- Iskanderov, T. (2009) Current Status of the Caucasus Toad (*Bufo verrucosissimus* Pall., 1814) and Caucasus Parsley Frog (*Pelodytes caucasicus* Boul., 1896) in Azerbaijan. *Status and Protection of Globally Threatened Species in the Caucasus*, 151.
- Jakob, C., Poizat, G., Veith, M., Seitz, A. & Crivelli, A.J. (2003) Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology. *Hydrobiologia*, 499, 51–61.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801–1806.

- Jezkova, T., Leal, M. & Rodríguez-Robles, J. A. (2013) Genetic drift or natural selection? Hybridization and asymmetric mitochondrial introgression in two Caribbean lizards (*Anolis pulchellus* and *Anolis krugi*). *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 1458–1471.
- Johansson, F. & Richter-Boix, A. (2013) Within-population developmental and morphological plasticity is mirrored in between-population differences: linking plasticity and diversity. *Evolutionary Biology*, 40, 494–503.
- Jourdan-Pineau, H., David, P. & Crochet, P.A. (2012) Phenotypic plasticity allows the Mediterranean parsley frog *Pelodytes punctatus* to exploit two temporal niches under continuous gene flow. *Molecular Ecology*, 21, 876–886.
- Komaki, S., Kurabayashi, A., Islam, M. M., Tojo, K., & Sumida, M. (2012) Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years. *Zoological Science*, 29, 351–358.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. & Mayrose, I. (2015) CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1179–1191.
- Kuchta, S.R., Parks, D.S., Mueller, R.L. & Wake, D.B. (2009) Closing the ring: historical biogeography of the salamander ring species *Ensatina eschscholtzii*. *Journal of Biogeography*, 36, 982–995.
- Kuzmin, S. L. (1997) *Pelodytes caucasicus* (Boulenger, 1896). In: Gasc, J. P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J. P., Maurin, H., Oliveira, M. E., Sofianidou, T. S., Veith, M. & Zúiderwijk, A. (Eds.) *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*. Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire Naturelle, Paris, pp. 114–115.
- Lacomba, V. & Sancho, V. (1999) Atlas de anfibios y reptiles de la Comunidad Valenciana. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 10, 2–10.
- Lanza, B. (1983) *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*. 27. *Amphibia, Reptilia*. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Verona, 196 pp.
- Lataste, F. (1876) Essai d'une faune herpétologique de la Gironde. *Actes Société Linnéenne de Bordeaux*, 30, 193–544.
- Le Garff, B. (1989) *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1802). In: Castanet, J. & Guyétant, R. (Eds.), *Atlas de Répartition des Amphibiens et Reptiles de France*. Société Herpétologique de France, Paris, pp. 71.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009) DNASP v5: a software for comprehensive analysis of polymorphism DNA data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Liu, K., Wang, F., Chen, W., Tu, L., Min, M.S., Bi, K. & Fu, J. (2010) Rampant historical mitochondrial genome introgression between two species of green pond frogs, *Pelophylax nigromaculatus* and *P. plancyi*. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 201.
- Lizana, M., Ciudad Pizarro, M. J. & Pérez-Mellado, V. (1986) Uso de los recursos tróficos de una comunidad ibérica de anfibios. *Revista Española de Herpetología*, 1, 207–272.
- Lobo, J.M., Martínez-Solano, Í. & Sanchiz, B. (2016) A review of the palaeoclimatic inference potential of Iberian Quaternary fossil batrachians. *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments*, 96, 125–148.
- MacLeod, A., Rodríguez, A., Vences, M., OroscooterWengel, P., García, C., Trillmich, F., Gentile, G., Caccone, A., Quezada G. & Steinfartz, S. (2015) Hybridization masks speciation in the evolutionary history of the Galápagos marine iguana. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 20150425.
- Malone, J.H. & Fontenot, B.E. (2008) Patterns of reproductive isolation in toads. *PLoS One*, 3, e3900.
- Márquez, R., Pargana, J.M. & Crespo, E. G. (2001) Acoustic competition in male *Pelodytes ibericus*. Interactive playback tests. *Copeia*, 2001, 1142–1150.
- Martínez-Rica, J. P. (1983) Atlas herpetológico del Pirineo. *Munibe Antropología-Arqueología*, 35, 51–80.
- Martínez-Solano, Í. (2006) Atlas de distribución y estado de conservación de los anfibios de la Comunidad de Madrid. *Graellsia*, 62, 253–291.
- Martínez-Solano, Í. & García-París, M. (2001) Distribución y estado de conservación de *Alytes obstetricans* y *Pelodytes punctatus* en el SE de Madrid. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 12, 37–41.
- Martínez-Solano, Í. & Sanchiz, B. (2005) Anfibios y Reptiles del Pleistoceno medio de Ambrona. In: Santonja, M. & Pérez, González, A. (Eds.), *Los yacimientos paleolíticos de Ambrona y Torralba (Soria). Un siglo de investigaciones arqueológicas*. Museo Arqueológico Regional, Alcalá de Henares, pp. 232–239.
- Mateo, J.A., Pleguezuelos, J.M., Fahd, S., Geniez, P. & Martínez-Medina, F.J. (2003) *Los anfibios, los reptiles y el Estrecho de Gibraltar. Un ensayo sobre la herpetofauna de Ceuta y su entorno*. Instituto de Estudios Ceutíes, Ceuta, 388 pp.
- Matos C., Sillero N. & Soares A (2010) New records of *Pelodytes* spp. and *Pleurodeles waltl* outside their distribution range in northern Portugal. *Herpetology Notes* 3, 293–294.
- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshall, D.F., Husmeier, D. & McGuire, G. (2004) TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics*, 20, 1806–1807.
- Miralles, A. & Vences, M. (2013) New metrics for comparison of taxonomies reveal striking discrepancies among species delimitation methods in *Madascincus* lizards. *PLoS ONE* 8, e68242.
- Mo, Y., Zhang, W., Zhou, S., Chen, T., Tang, H., Meng, Y. & Chen, W. (2013) A new species of *Kaloula* (Amphibia: Anura: Microhylidae) from southern Guangxi, China. *Zootaxa*, 3710, 165–178.
- Monahan, W.B., Pereira, R.J. & Wake, D.B. (2012) Ring distributions leading to species formation: a global topographic analysis of geographic barriers associated with ring species. *BMC Biology*, 10, 20.
- Montori, A., Giner, G., Béjar, X. & Álvarez, D. (2011) Descenso brusco de temperaturas y nevadas tardías como causas de mortalidad de anfibios durante el período reproductor. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 22, 72–74.

- Moritz, C., Schneider, C.J., & Wake, D.B. (1992) Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, 41, 273–291.
- Muñoz del Viejo, A., Pérez, J.L., Rodríguez, S.P. & García, J.M. (2005) *Atlas de los anfibios y reptiles de la provincia de Cáceres y zonas importantes para la herpetofauna en la provincia de Badajoz, Informe Final*. UNEX- Dirección general de Medio Ambiente, Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de Extremadura, Badajoz.
- Narins, P. M., & Capranica, R. R. (1978) Communicative significance of the two-note call of the treefrog *Eleutherodactylus coqui*. *Journal of Comparative Physiology*, 127, 1–9.
- Nöllert, A. & Nöllert, C. (1992) *Die Amphibien Europas*. Kosmos, Stuttgart, 382 pp.
- Nunes, A.L., Orizaola, G., Laurila, A. & Rebelo, R. (2014) Morphological and life-history responses of anurans to predation by an invasive crayfish: an integrative approach. *Ecology and Evolution*, 4, 1491–1503.
- Olague, M.C. & Lagares, J. L. (2000) Cavidades naturales del término municipal de Ejulve (Somontano turolense): datos espeleométricos y biospeleológicos. *Revista del Instituto de Estudios Turolenses*, 88, 75–108.
- Oliveira, M. E., Paillette, M., Rosa, H. D., & Crespo, E. G. (1991) A natural hybrid between *Hyla arborea* and *Hyla meridionalis* detected by mating calls. *Amphibia-Reptilia*, 12, 15–20.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. & Vences, M. (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7, 16.
- Paillette, M., Oliveira, M.E., Rosa, H.D. & Crespo, E.G. (1992) Is there a dialect in *Pelodytes punctatus* from southern Portugal? *Amphibia-Reptilia*, 13, 97–108.
- Palomo, J.A. (1993) Atlas provisional de los anfibios y reptiles de Extremadura. *Aegyptus*, 11, 7–20.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L. & Grabowski, G. (1991) The Simple Fool's Guide to PCR. Version 2.0. Univ. Hawaii, Honolulu.
- Parent, G.H. (1989) Essai de délimitation de territoires biogéographiques pour l'herpétofaune du Benelux. *Bulletin Société Naturelle de Luxembourg*, 89, 81–103.
- Pargana, J.M. (1998) *Características espectrais e temporais e correlações genéticas do canto de acasalamento de Pelodytes punctatus (Amphibia, Anura)*. Masters Thesis, Departamento de Biofísica, Universidade de Lisboa, 163 pp.
- Pargana, J.M., Marquez, R., Reques, R., Sánchez - Herráiz, M.J., Tejedo, M. & Crespo, E.G., (2003) The mating call of *Pelodytes ibericus* (Anura, Pelodytidae). *Herpetological Journal*, 13, 199–204.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L. & McMahon, T.A. (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, 4, 439–473.
- Pereira, R.J., Monahan, W.B. & Wake, D.B. (2011) Predictors for reproductive isolation in a ring species complex following genetic and ecological divergence. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 194.
- Petitot, M., Manceau, N., Geniez, P. & Besnard, A. (2014) Optimizing occupancy surveys by maximizing detection probability: application to amphibian monitoring in the Mediterranean region. *Ecology and Evolution*, 4, 3538–3549.
- Pinho, C., Rocha, S., Carvalho, B.M., Lopes, S., Mourao, S., Vallinoto, M., Brunes, T.O., Haddad, C.F.B., Gonçalves, H. & Sequeira, F. (2010) New primers for the amplification and sequencing of nuclear loci in a taxonomically wide set of reptiles and amphibians. *Conservation Genetic Resources*, 2, 181–185.
- Pleguezuelos, J.M., Márquez, R. & Lizana, M. (Eds) (2002) *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza- Asociación Herpetológica Española, Madrid, 587 pp.
- Pleguezuelos, J.M., Reques, R. & Caro, J. (2004) *Parajes importantes para la conservación de anfibios y reptiles en Andalucía. Informe primero. Julio 2004*. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, Sevilla.
- Pottier, G. (2008) *Atlas de répartition des reptiles et amphibiens de Midi-Pyrénées*. Nature Midi-Pyrénées, Toulouse, 126 pp.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Rakotoarison, A., Crottini, A., Müller, J., Rödel, M. O., Glaw, F. & Vences, M. (2015) Revision and phylogeny of narrow-mouthed treefrogs (*Cophyla*) from northern Madagascar: integration of molecular, osteological, and bioacoustic data reveals three new species. *Zootaxa*, 3937, 61–89.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D. & Drummond, A.J. (2014) Tracer v1.6. Available from <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>> (accessed 1 November 2015).
- Renoult, J.P., Geniez, P., Bacquet, P., Benoit, L. & Crochet, P.A. (2009) Morphology and nuclear markers reveal extensive mitochondrial introgressions in the Iberian Wall Lizard species complex. *Molecular Ecology*, 18, 4298–4315.
- Reques, R. (2000) *Anfibios, Ecología y Conservación*. Serie Recursos Naturales de Córdoba. Diputación de Córdoba, Delegación de Medio Ambiente y Protección Civil. Córdoba, 140 pp.
- Reques, R. (2014) Sapillo moteado ibérico - *Pelodytes ibericus*. In: Salvador, A., Martínez-Solano, I. (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid <<http://www.vertebradosibericos.org/>> (accessed 1 November 2015).
- Reques, R. & Tejedo, M. (1991) Dinámica y hábitats reproductivos de una comunidad de Anfibios en la Sierra de Cabra. *Revista Española de Herpetología* 6, 49–54.
- Reques, R. & Tejedo, M. (2014) Los Anfibios de los Humedales del Sur de Córdoba. In: De la Cruz, J. (Coord.), *Humedales cordobeses: 30 años de protección*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Junta de Andalucía, Sevilla, pp. 159–164.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A. & Montori, A. (2006) Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia*, 27, 549–559.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A., Montori, A. & García, J. (2007) Tadpole diet selection varies with the ecological context in predictable ways. *Basic and Applied Ecology*, 8, 464–474.
- Roček, Z. (2005) Late Miocene Amphibia from Rudabánya. *Palaeontographia Italica*, 90, 11–29.

- Roček, Z. & Rage, J.C. (2000) Tertiary Anura of Europe, Asia, Africa, Asia, North America, and Australia. In: Heatwole, H., Carroll, R.L. (Eds.), *Amphibian Biology*. Surrey Beatty, Chipping Norton, pp.1332–1387.
- Roelants, K., Gower, D.J., Wilkinson, M., Loader, S.P., Biju, S.D., Guillaume, K., Moriau, L. & Bossuyt, F. (2007) Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 104, 887–892.
- Salvador, A. & García-París, M. (2001) *Anfibios Españoles. Identificación, Historia natural y Distribución*. Canseco Editores, Talavera de la Reina, 269 pp.
- Salvidio, S., Lamagni, L., Bombi, P. & Bologna, M. A. (2004) Distribution, ecology and conservation of the parsley frog (*Pelodytes punctatus*) in Italy (Amphibia, Pelodytidae). *Bollettino di Zoologia*, 71, 73–81.
- Salvidio, S. & Bologna, M.A. (2007) *Pelodytes punctatus*. In: Lanza, B., Andreone, F., Bologna, M. A., Corti, C. & Razzetti, E. (Eds.), *Fauna d'Italia, vol. XLII, Amphibia*. Calderini de Il Sole, Bologna.
- Salzburger, W., Ewing, G.B. & Von Haeseler, A. (2011) The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20, 1952–1963.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor Press, New York, 1626 pp.
- Sánchez-Herráiz, M.J. (2004) *Análisis de la diferenciación genética, morfológica y ecológica asociadas a la especiación en el género Pelodytes (Anura, Pelodytidae)*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 374 pp.
- Sánchez-Herráiz, M.J., Barbadillo, L., Machordom, A. & Sanchiz, B. (2000) A new species of pelodytid frog from the Iberian Peninsula. *Herpetologica*, 56, 105–118.
- Sanchiz, B. (1978) Nuevos restos fósiles de la familia Pelodytidae (Amphibia, Anura). *Estudios Geológicos*, 34, 9–27.
- Sanchiz, B. (1998a) *Salientia. Handbuch der Paläoherpetologie Pars 4*. Dr. F. Pfeil, Munich, 275 pp.
- Sanchiz, B. (1998b) Vertebrates from the early Miocene lignite deposits of the opencast mine Oberdorf (Western Styrian Basin, Austria): 2. Amphibia. *Annalen des Naturhistorischen Museums Wien A*, 99, 13–29.
- Sanchiz, B., Tejedo, M. & Sánchez-Herráiz, M.J. (2002) Osteological differentiation among Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Graellsia*, 58, 35–68.
- Sequeira, F., Ferrand, N. & Harris, D. (2006) Assessing the phylogenetic signal of the nuclear beta-fibrinogen intron 7 in salamandrids (Amphibia: Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, 27, 409–418.
- Shen, X.X., Liang, D. & Zhang, P. (2012) The development of three long universal nuclear protein-coding locus markers and their application to osteichthyan phylogenetics with nested PCR. *PLoS ONE* 7, e39256.
- Silvestro, D. & Michalak, I. (2010) RAXML GUI: a graphical front-end for RAXML. <<http://sourceforge.net/projects/raxmlgui/>> (accessed 1 November 2015).
- Sindaco, R. & Andreone, F. (1988) Considerazioni sulla distribuzione di *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1802) in territorio italiano. *Atti del Museo Civico di Scienze Naturali di Trieste*, 41, 161–167.
- Sindaco, R., Biggi, E., Boano, G. & Delmastro, G. B. (2002) Novitates herpetologicae pedemontanae. *Rivista Piemontese di Storia Naturale*, 23, 195–206.
- Singhal, S. & Moritz, C. (2012) Testing hypotheses for genealogical discordance in a rainforest lizard. *Molecular Ecology*, 21, 5059–5072.
- Sites, J.W. Jr. & Marshall, J.C. (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 462–470.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688–2690.
- StatSoft, Inc. (2007) STATISTICA (data analysis software system), version 7.1 <www.statsoft.com> (accessed 1 November 2015).
- Steiner, H.M. (1968) *Pelodytes caucasicus* Boulenger, 1896 (Pelobatidae, Amphibia) in der Türkei. *Annalen des Naturhistorischen Museums Wien*, 72, 291–298.
- Steinfartz, S., Veith, M. & Tautz, D. (2000) Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. *Molecular Ecology*, 9, 397–410.
- Stephens, M., Smith, N.J. & Donnelly, P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68, 978–989.
- Stephens, M. & Donnelly, P. (2003) A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics*, 73, 1162–1169.
- Stoate, C., Báldi, A., Beja, P., Boatman, N.D., Herzog, I., Van Doorn, A., de Snoo, G.R., Laksoy, L. & Ramwell, C. (2009) Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe—a review. *Journal of Environmental Management*, 91, 22–46.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Tejedo, M. (1991) Effect of predation by two species of sympatric tadpoles on embryo survival in natterjack toads (*Bufo calamita*). *Herpetologica*, 47, 322–327.
- Toxopeus, A.G., Ohm, M. & Arntzen, J.W. (1993) Reproductive biology of the parsley frog, *Pelodytes punctatus*, at the northernmost part of its range. *Amphibia-Reptilia*, 14, 131–147.
- Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A. & Warman, M.L. (2000) Preparation of PCR quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques*, 29, 52–54.
- van de Vliet, M.S., Beebe, T.J. & Diekmann, O.E. (2012) Genetic evidence for a distinct *Pelodytes* lineage in southwest Portugal: implications for the use of pre-developed microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 13, 605–611.

- 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.
- Veith, M., Fromhage, L., Kosuch, J. & Vences, M. (2006) Historical biogeography of Western Palaearctic pelobatid and pelodytid frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Contributions to Zoology*, 75, 109–120.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. M., & Vieites, D. R. (2005) Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360, 1859–1868.
- Vences, M., Gehara, M., Köhler, J. & Glaw, F. (2012) Description of a new Malagasy treefrog (*Boophis*) occurring syntopically with its sister species, and a plea for studies on non-allopatric speciation in tropical amphibians. *Amphibia-Reptilia*, 33, 503–520.
- Vences, M., Glaw, F., Köhler, J. & Wollenberg, K.C. (2010) Molecular phylogeny, morphology and bioacoustics reveal five additional species of arboreal microhylids of the genus *Anodonthyla* from Madagascar. *Contributions to Zoology*, 79, 1–32.
- Vences, M., Hauswaldt, J. S., Steinfartz, S., Rupp, O., Goesmann, A., Künzel, S., Orozco-terWengel P., Vieites, D.R., Nieto-Roman, S., Haas, S., Laugsch, C., Gehara, M., Bruchmann, S., Pabijan, M., Ludewig, A.K., Rudert, D., Angelini, C., Borkin, L. J., Crochet, P.A., Crottini, A., Dubois, A., Ficetola, G. F., Galán, P., Geniez, P., Hachtel, M., Jovanovic, O., Litvinchuk, S. N., Lymberakis, P., Ohler, A., & Smirnov, N. A. (2013) Radically different phylogeographies and patterns of genetic variation in two European brown frogs, genus *Rana*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 657–670.
- Vento, D. & Pérez, C. (2011) Datos sobre la herpetofauna del término municipal de Biar (Alicante, este de España). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 22, 130–134.
- Vieites, D.R., Wollenberg, K.C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F. & Vences, M. (2009) Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 106, 8267–8272.
- Wake, D.B. (1997) Incipient species formation in salamanders of the *Ensatina* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 94, 7761–7767.
- Weisrock, D.W., Rasoloarison, R.M., Fiorentino, I., Ralison, J.M., Goodman, S.M., Kappeler, P.M. & Yoder, A.D. (2010) Delimiting species without nuclear monophyly in Madagascar's mouse lemurs. *PLoS ONE* 5, e9883.
- Wielstra, B. & Arntzen, J. W. (2012) Postglacial species displacement in *Triturus* newts deduced from asymmetrically introgressed mitochondrial DNA and ecological niche models. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 161.
- Zaldívar, C. (2004) Los anfibios de La Rioja. *Páginas de Información Ambiental Gobierno de la Rioja*, 16, 24–28.
- Zamudio, K.R. & Savage, W.K. (2003) Historical isolation, range expansion, and secondary contact of two highly divergent mitochondrial lineages in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Evolution*, 57, 1631–1652.
- Zhang, H., Yan, J., Zhang, G. & Zhou, K. (2008) Phylogeography and demographic history of Chinese black-spotted frog populations (*Pelophylax nigromaculata*): evidence for independent refugia expansion and secondary contact. *BMC Evolutionary Biology*, 8, e21.
- Zieliński, P., Nadachowska-Brzyska, K., Wielstra, B., Szkotak, R., Covaciu-Marcov, S.D., Cogălniceanu, D., & Babik, W. (2013) No evidence for nuclear introgression despite complete mtDNA replacement in the Carpathian newt (*Lissotriton montandoni*). *Molecular Ecology*, 22, 1884–1903.

TABLE 1. Pairwise sequence divergence (uncorrected p-distances in percent, below diagonal) in two mitochondrial gene segments commonly used for DNA barcoding of amphibians (e.g., Vences *et al.* 2005), between four sibling species of *Pelodytes* (the strongly divergent *P. caucasicus* is not considered): 16S rRNA (16S) and mt-CO1. Characters above diagonal indicate additional morphometric and bioacoustic differences; morphological differences included are those that showed significant differences after Bonferroni correction, and usually congruently in comparisons of males and females (see Tables 3-4; except tympanum diameter which was only slightly significantly different between females of *P. ibericus* vs. *P. punctatus*).

	<i>ibericus</i>	<i>atlanticus</i> sp. nov.	<i>hespericus</i> sp. nov.	<i>punctatus</i>
<i>ibericus</i>	---	limb length , tympanum size // B note number	body size, limb length, tympanum diameter // B note number	body size, limb length, tympanum diameter
<i>atlanticus</i> sp. nov.	16S: 0.8% mt-CO1: 5.7%	---	body size // B note number	body size // B note number
<i>hespericus</i> sp. nov.	16S: 1.0% mt-CO1: 4.7%	16S: 1.0% mt-CO1: 4.1%	---	B note number
<i>punctatus</i>	16S: 1.5% mt-CO1: 6.7%	16S: 1.5% mt-CO1: 5.7%	16S: 1.7% mt-CO1: 4.3%	---

TABLE 2. Genetic diversity for the mitochondrial and nuclear markers analyzed in this study. (*bp*) base pairs; (*n*) number of sequences; (*h*) number of haplotypes; (*s*) number of polymorphic sites; (*s**) number of parsimony-informative sites; (*Hd*) haplotype diversity; (π) nucleotide diversity; (θ_w) Watterson's (1975) mutation parameter Theta.

mtDNA	<i>bp</i>	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>s</i>	<i>s*</i>	<i>Hd</i>	π	θ_w
CYB-ND4	1492	90	55	154	132	0.982±0.005	0.03065±0.00051	0.02034±0.00522
nDNA								
KIAA1239	801	78	9	8	5	0.808±0.022	0.00214±0.00014	0.00203±0.00086
RAG1	1309	64	19	23	18	0.857±0.030	0.00325±0.00029	0.00372±0.00122
PPP3CAint4	935	78	11	14	14	0.837±0.024	0.01005±0.00045	0.00723±0.00261
<i>β-fibint7</i>	752	76	32	40	35	0.938±0.014	0.01135±0.00056	0.01085±0.00320
RPL3int5	637	16	9	20	16	0.892±0.060	0.01008±0.00152	0.00949±0.00390
Cherpint7	676	16	6	13	13	0.858±0.047	0.00870±0.00080	0.00581±0.00255

TABLE 3. Summary of morphometric measurements of males (M) and females (F) of the four western lineages of *Pelodytes*. Variables as in materials and methods; variable names preceded by REL are relative values after division by SVL. Values are mean \pm standard deviation, with minimum and maximum values in parentheses.

	<i>atlanticus</i> M	<i>ibericus</i> M	<i>hespericus</i> M	<i>punctatus</i> M	<i>atlanticus</i> F	<i>ibericus</i> F	<i>hespericus</i> F	<i>punctatus</i> F
N	37	31	35	30	10	12	12	10
SVL	31.43 \pm 2.5 5 (22.7– 39.2)	31.22 \pm 2.4 4 (26.8– 37.2)	35.29 \pm 2.4 0 (30.1– 39.0)	35.51 \pm 2.6 5 (29.58– 41.6)	34.66 \pm 2.4 4 (31.9– 40.4)	33.31 \pm 3.9 5 (29.0– 42.2)	39.75 \pm 1.8 4 (36.7– 43.3)	38.84 \pm 5.2 1 (33.2– 51.0)
HW	11.26 \pm 0.8 0 (9.2–13.2)	11.02 \pm 0.9 3 (9.59– 13.3)	12.55 \pm 0.7 7 (10.9– 14.9)	12.28 \pm 1.0 8 (10.6– 15.0)	11.86 \pm 0.6 2 (10.7– 12.6)	10.87 \pm 1.1 2 (9.6–13.3)	13.22 \pm 0.8 1 (12.4– 15.2)	12.57 \pm 1.1 9 (10.7– 15.2)
HL	11.13 \pm 0.7 5 (9.7–13.4)	10.81 \pm 0.8 5 (9.6–13.0)	12.16 \pm 0.8 3 (10.2– 13.7)	12.29 \pm 0.8 8 (10.9– 14.4)	11.59 \pm 0.4 9 (10.7– 12.3)	10.83 \pm 1.0 5 (9.5–12.9)	12.67 \pm 0.4 2 (12.09– 13.5)	12.54 \pm 1.2 9 (10.8– 15.3)
TD	1.87 \pm 0.31 (1.2–2.8)	2.08 \pm 0.22 (1.6–2.6)	1.95 \pm 0.29 (1.4–2.7)	2.14 \pm 0.26 (1.5–2.6)	2.11 \pm 0.38 (1.7–2.8)	2.07 \pm 0.36 (1.6–2.6)	1.98 \pm 0.13 (1.7–2.3)	2.15 \pm 0.31 (1.9–2.9)
ED	3.67 \pm 0.33 (2.5–4.3)	3.35 \pm 0.44 (2.7–4.7)	3.78 \pm 0.27 (3.2–4.4)	3.98 \pm 0.52 (2.9–4.8)	3.91 \pm 0.39 (3.1–4.5)	3.40 \pm 0.56 (2.3–4.4)	3.79 \pm 0.33 (3.2–4.35)	4.06 \pm 0.28 (3.5–4.5)
END	2.80 \pm 0.28 (2.3–3.6)	2.89 \pm 0.24 (2.5–3.4)	3.42 \pm 0.31 (2.8–4.3)	3.29 \pm 0.29 (2.8–4.0)	3.04 \pm 0.27 (2.6–3.4)	2.94 \pm 0.33 (2.4–3.4)	3.47 \pm 0.37 (2.6–4.1)	3.45 \pm 0.41 (3.0–4.4)
NSD	2.33 \pm 0.25 (1.9–3.0)	2.15 \pm 0.25 (1.7–3.0)	2.52 \pm 0.30 (1.9–3.1)	2.33 \pm 0.31 (1.7–3.0)	2.46 \pm 0.16 (2.2–2.7)	2.15 \pm 0.38 (1.7–2.9)	2.55 \pm 0.31 (2.1–3.2)	2.26 \pm 0.31 (1.7–2.8)
NND	2.50 \pm 0.31 (1.8–3.1)	2.83 \pm 0.33 (2.1–3.5)	2.76 \pm 0.36 (2.1–3.6)	2.81 \pm 0.36 (1.7–3.6)	2.49 \pm 0.22 (2.1–2.8)	2.74 \pm 0.40 (2.2–3.5)	2.90 \pm 0.30 (2.6–3.67)	2.82 \pm 0.36 (2.3–3.4)
HAL	8.56 \pm 0.47 (7.2–9.4)	7.81 \pm 0.83 (6.3–10.0)	9.80 \pm 0.69 (8.1–10.8)	9.60 \pm 0.78 (8.2–11.2)	9.32 \pm 0.48 (8.5–10.0)	7.64 \pm 0.87 (6.7–9.6)	10.61 \pm 0.7 3 (9.3–12.3)	9.89 \pm 1.08 (8.2–12.0)
FORL	20.08 \pm 1.4 2 (15.2– 22.9)	17.72 \pm 1.9 9 (13.9– 22.4)	23.46 \pm 2.0 3 (19.7– 27.4)	22.82 \pm 2.4 2 (18.2– 28.4)	22.10 \pm 1.7 0 (19.5– 24.7)	17.87 \pm 2.3 5 (15.0– 23.0)	25.31 \pm 2.2 7 (22.4– 29.8)	23.00 \pm 2.4 8 (19.2– 27.8)
HIL	50.23 \pm 2.7 9 (40.0– 55.5)	46.10 \pm 4.4 0 (38.5– 57.7)	56.94 \pm 4.0 3 (47.64– 65.0)	58.36 \pm 4.9 5 (49.2– 70.1)	55.35 \pm 2.7 1 (51.6– 58.4)	44.72 \pm 5.6 2 (38.5– 58.1)	60.24 \pm 3.7 5 (55.6– 69.5)	60.02 \pm 5.9 4 (52.8– 72.2)
FOL	16.08 \pm 1.2 1 (12.7– 19.8)	19.04 \pm 3.6 9 (12.7– 24.2)	17.70 \pm 1.4 2 (14.3– 20.8)	18.20 \pm 1.4 8 (15.8– 21.6)	17.10 \pm 1.1 0 (15.3– 18.3)	17.71 \pm 3.5 7 (12.4– 22.6)	18.45 \pm 1.4 0 (16.8– 21.9)	18.12 \pm 1.5 1 (15.7– 20.7)
FOTL	24.48 \pm 1.4 9 (20.3– 29.6)	18.08 \pm 4.7 3 (12.3– 28.0)	27.26 \pm 1.9 6 (22.7– 31.0)	27.68 \pm 2.3 3 (23.6– 33.3)	26.23 \pm 1.5 5 (24.1– 28.8)	18.19 \pm 5.2 7 (12.2– 27.7)	28.83 \pm 2.2 7 (25.7– 35.0)	27.99 \pm 2.6 7 (24.6– 32.9)
TIL	15.95 \pm 0.8 3 (13.3– 17.9)	14.15 \pm 1.1 5 (12.0– 16.8)	17.97 \pm 1.2 7 (15.3– 20.3)	17.25 \pm 1.5 2 (14.7– 20.6)	17.38 \pm 1.2 2 (15.3– 19.4)	14.14 \pm 1.7 5 (12.4– 18.4)	19.24 \pm 1.3 8 (18.0– 23.2)	17.87 \pm 1.6 2 (15.6– 21.1)
RELHW	0.36 \pm 0.02 (0.30– 0.41)	0.35 \pm 0.02 (0.32– 0.38)	0.36 \pm 0.01 (0.34– 0.38)	0.35 \pm 0.02 (0.31– 0.40)	0.34 \pm 0.02 (0.31– 0.37)	0.33 \pm 0.02 (0.31– 0.37)	0.33 \pm 0.02 (0.30– 0.35)	0.33 \pm 0.02 (0.30– 0.35)
RELHL	0.36 \pm 0.02 (0.28– 0.43)	0.35 \pm 0.01 (0.32– 0.37)	0.34 \pm 0.01 (0.32– 0.37)	0.35 \pm 0.01 (0.33– 0.37)	0.34 \pm 0.02 (0.30– 0.37)	0.33 \pm 0.02 (0.31– 0.39)	0.32 \pm 0.01 (0.29– 0.33)	0.32 \pm 0.02 (0.29– 0.35)
RELTD	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.05 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE
PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

	(0.04– 0.09)	(0.06– 0.08)	(0.04– 0.07)	(0.05– 0.08)	(0.05– 0.08)	(0.05– 0.07)	(0.04– 0.06)	(0.04– 0.09)
RELED	0.12±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.02	0.10±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01
	(0.09– 0.14)	(0.09– 0.13)	(0.09– 0.13)	(0.08– 0.14)	(0.09– 0.14)	(0.08– 0.12)	(0.08– 0.11)	(0.08– 0.12)
RELEND	0.09±0.01	0.09±0.01	0.10±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01
	(0.07– 0.11)	(0.08– 0.11)	(0.08– 0.12)	(0.08– 0.11)	(0.07– 0.10)	(0.08– 0.10)	(0.06– 0.10)	(0.08– 0.10)
RELNSD	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01
	(0.05– 0.09)	(0.06– 0.08)	(0.06– 0.09)	(0.05– 0.08)	(0.06– 0.08)	(0.05– 0.08)	(0.05– 0.08)	(0.04– 0.07)
RELNND	0.08±0.01	0.09±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01
	(0.06– 0.10)	(0.07– 0.11)	(0.06– 0.10)	(0.06– 0.10)	(0.06– 0.08)	(0.06– 0.09)	(0.07– 0.08)	(0.06– 0.09)
RELHAL	0.27±0.02	0.25±0.01	0.28±0.02	0.27±0.01	0.27±0.02	0.23±0.01	0.27±0.01	0.26±0.01
	(0.21– 0.32)	(0.23– 0.28)	(0.25– 0.32)	(0.25– 0.31)	(0.24– 0.30)	(0.21– 0.25)	(0.25– 0.29)	(0.24– 0.27)
RELFOL	0.53±0.06	0.61±0.12	0.50±0.03	0.51±0.02	0.51±0.06	0.54±0.12	0.46±0.02	0.47±0.03
	(0.39– 0.66)	(0.43– 0.77)	(0.44– 0.59)	(0.48– 0.55)	(0.44– 0.64)	(0.36– 0.68)	(0.43– 0.51)	(0.41– 0.51)
RELNIL	0.51±0.03	0.45±0.03	0.51±0.04	0.49±0.02	0.50±0.05	0.43±0.04	0.48±0.02	0.46±0.03
	(0.41– 0.59)	(0.40– 0.54)	(0.44– 0.61)	(0.45– 0.56)	(0.44– 0.61)	(0.37– 0.49)	(0.46– 0.54)	(0.41– 0.51)
RELFOT L	0.78±0.06	0.58±0.13	0.77±0.04	0.78±0.04	0.76±0.06	0.54±0.13	0.72±0.03	0.72±0.04
	(0.62– 0.94)	(0.43– 0.78)	(0.69– 0.87)	(0.72– 0.87)	(0.67– 0.90)	(0.41– 0.71)	(0.69– 0.81)	(0.65– 0.78)
RLHIL	1.60±0.09	1.48±0.07	1.61±0.08	1.64±0.06	1.60±0.11	1.34±0.07	1.52±0.06	1.55±0.09
	(1.28– 1.76)	(1.35– 1.64)	(1.48– 1.79)	(1.54– 1.81)	(1.44– 1.83)	(1.22– 1.48)	(1.40– 1.61)	(1.42– 1.69)
RELFOR L	0.64±0.05	0.57±0.04	0.67±0.06	0.64±0.05	0.64±0.05	0.54±0.04	0.64±0.04	0.59±0.03
	(0.52– 0.74)	(0.47– 0.65)	(0.56– 0.78)	(0.55– 0.74)	(0.56– 0.70)	(0.49– 0.62)	(0.56– 0.69)	(0.55– 0.64)

TABLE 4. Results of univariate pairwise comparison of morphometric variables (all except SVL size-corrected, as ratios by SVL) between western lineages of *Pelodytes*, with Mann-Whitney U-tests. Upper diagonal, females; lower diagonal, males. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. Note that only significance values < 0.001 (bold) remain significant after Bonferroni correction over all 168 comparisons (for both sexes). All specimens of *P. ibericus*, *P. atlanticus* and *P. hespericus* were measured by JDR, whereas specimens of *P. punctatus* were measured by MV.

	<i>ibericus</i>	<i>atlanticus</i> <i>sp. nov.</i>	<i>hespericus</i> <i>sp. nov.</i>	<i>punctatus</i>
<i>ibericus</i>	---	HAL**, FOL**, TIL*, FOTL**, HIL**, FORL*	SVL*, TD***, HAL***, FOL*, TIL*, FOTL**, HIL***, FORL**	HAL*, FOL*, FOTL*, HIL**
<i>atlanticus sp. nov.</i>	NSD*, HAL***, FOL***, TIL***, FOTL***, HIL***, FORL**	---	SVL***, TD*, ED*, NSD*, FOL*, HIL*	SVL*, NSD***, TIL*, FORL*
<i>hespericus sp. nov.</i>	SVL***, TD*, END***, NND*, HAL***, FOL**, TIL***, FOTL**, HIL***, FORL***	SVL***, HL*, ED***, END***, FOL*	---	ED*, FORL*, HIL*
<i>punctatus</i>	SVL***, END*, HAL***, FOL***, TIL*, FOTL***, HIL***, FORL**	SVL***, HW**, HL*, END*, NSD***, TIL***	HW*, TD*, ED*, END*, NSD**, HAL*, TIL**	---

TABLE 5. Results from a PCA of morphometric measurements of male *Pelodytes*. Note that Principal Component (PC) 1 is mostly influenced by size effects and loadings are therefore of similar sign and dimension for all variables. Variables with loadings > 0.3 in bold.

	PC 1	PC 2	PC 3
SVL	-0.95119	0.023754	0.074338
HW	-0.93963	0.004191	0.030233
HL	-0.94413	0.088085	0.035760
TD	-0.67874	0.395073	-0.007625
ED	-0.70407	0.371672	0.429603
END	-0.85692	-0.026937	-0.075346
NSD	-0.71148	0.177329	-0.587476
NND	-0.74811	0.492479	-0.090643
HAL	-0.94768	-0.145687	0.014595
FORL	-0.87877	-0.377533	-0.002024
HIL	-0.97427	-0.130951	0.070810
FOL	-0.89800	-0.143823	0.005296
FOTL	-0.96514	-0.142446	0.047457
TIL	-0.93286	-0.264779	-0.012243
Eigenvalue	10.66331	0.86926	0.55902
% Total variance	76.16649	6.20898	3.99298
Cumulative Eigenvalue	10.66331	11.53257	12.09158
Cumulative %	76.16649	82.37547	86.36845

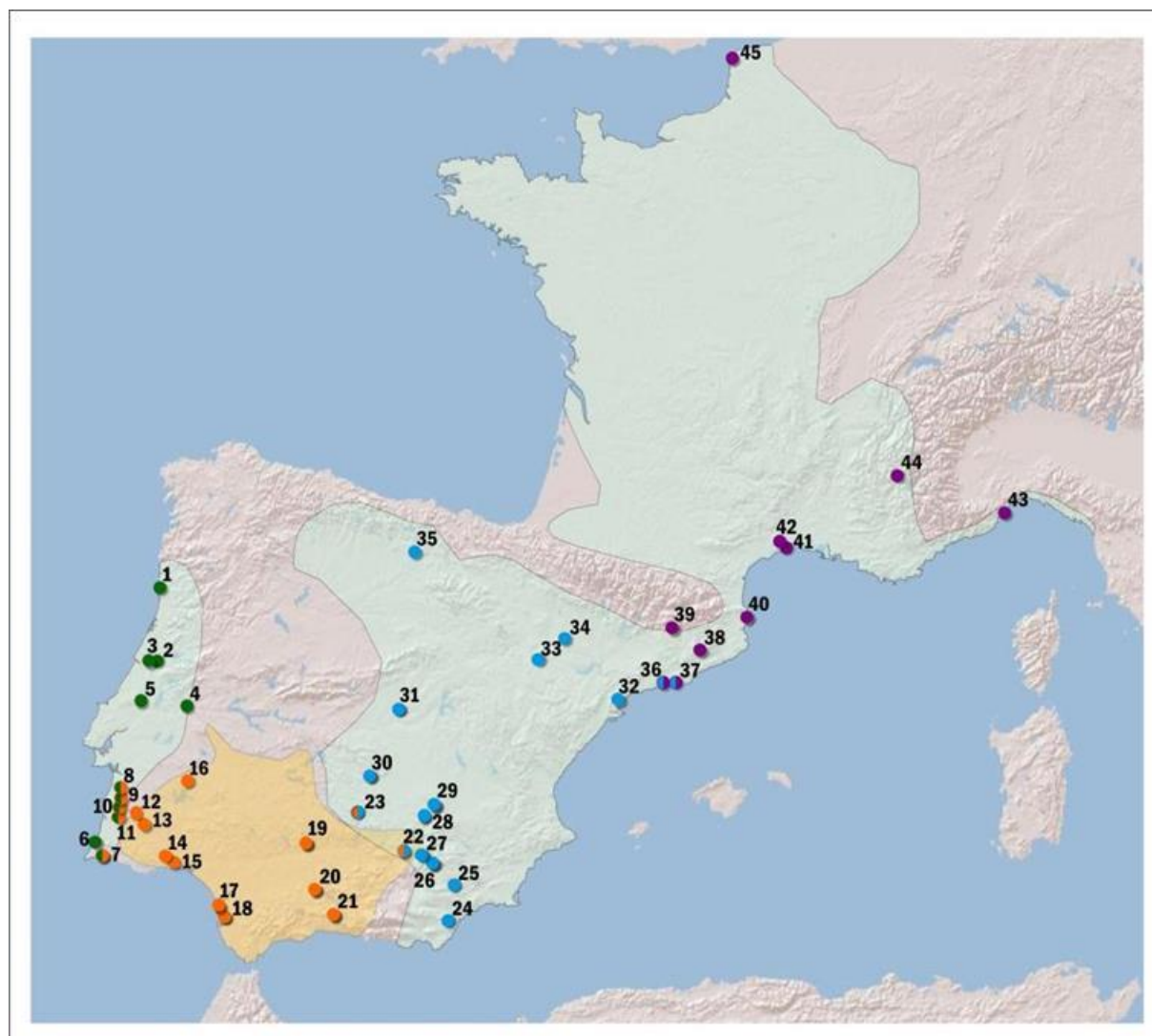


FIGURE 1. Location of 45 populations of *Pelodytes* sampled for molecular analysis (indicative map unscaled). Colored dots represent the four species described: green, lineage A (*P. atlanticus* sp. nov.); orange, lineage B (*P. ibericus*); blue, lineage C (*P. hespericus* sp. nov.); and purple, lineage D (*P. punctatus*). In some populations (7, 8, 9, 10, 11, 22, 23, 36 and 37) we found evidence for admixture (double-colored dots). Background colors represent the ranges of *P. punctatus* (blue) and *P. ibericus* (orange) according to current knowledge (www.iucn.org).

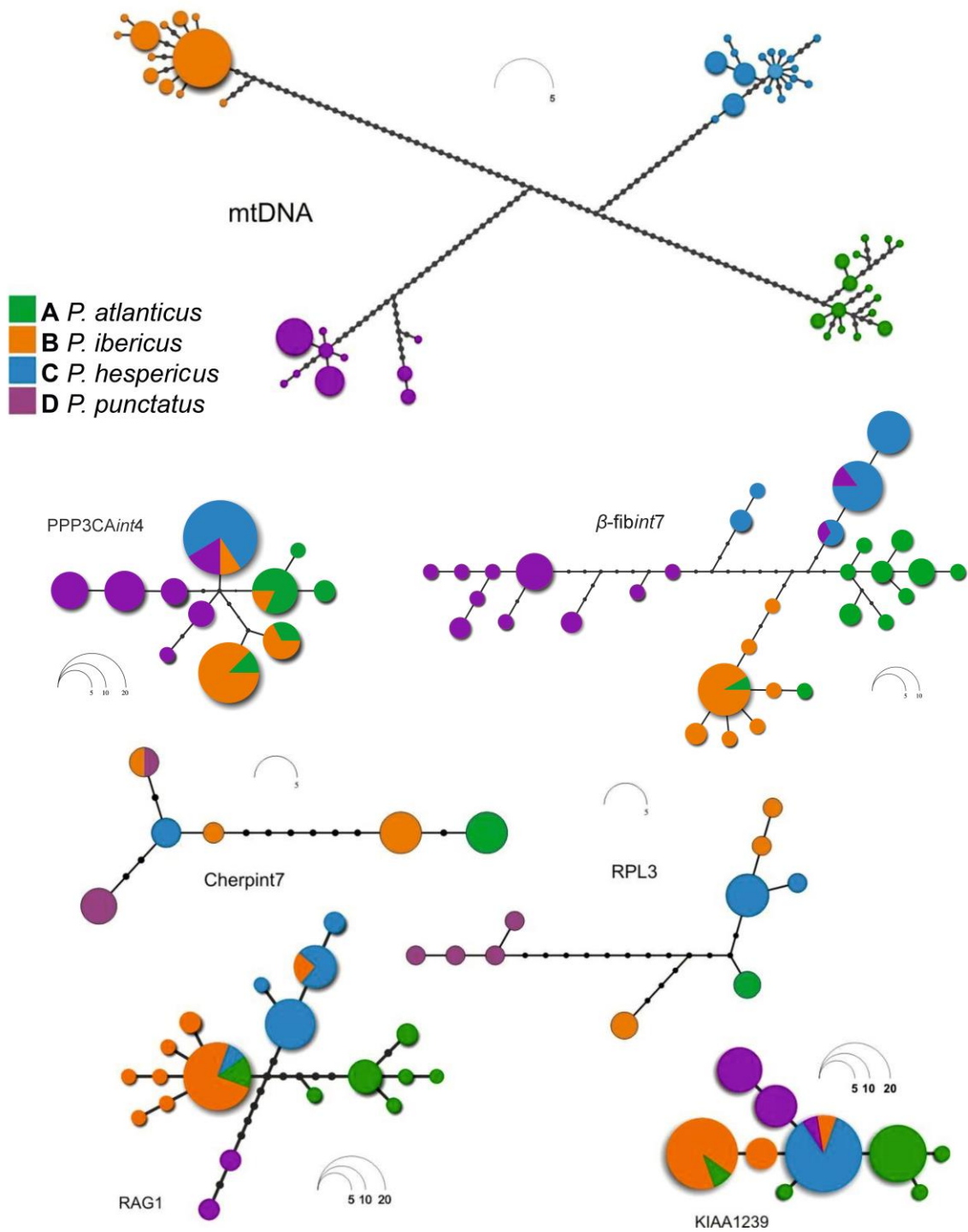


FIGURE 2. Median-joining networks of Western Palearctic *Pelodytes* based on six nuclear markers and mtDNA (mt-ND4+mt-CYB). Samples in the nDNA networks are colored according to their assignment to the four major clusters in the mtDNA network, corresponding to the species as color coded in Fig. 1. Each circle represents a different haplotype and its size is proportional to its relative frequency. Black dots represent inferred unsampled or extinct haplotypes. Markers RPL3 and Cherpint7 are represented at the same scale.

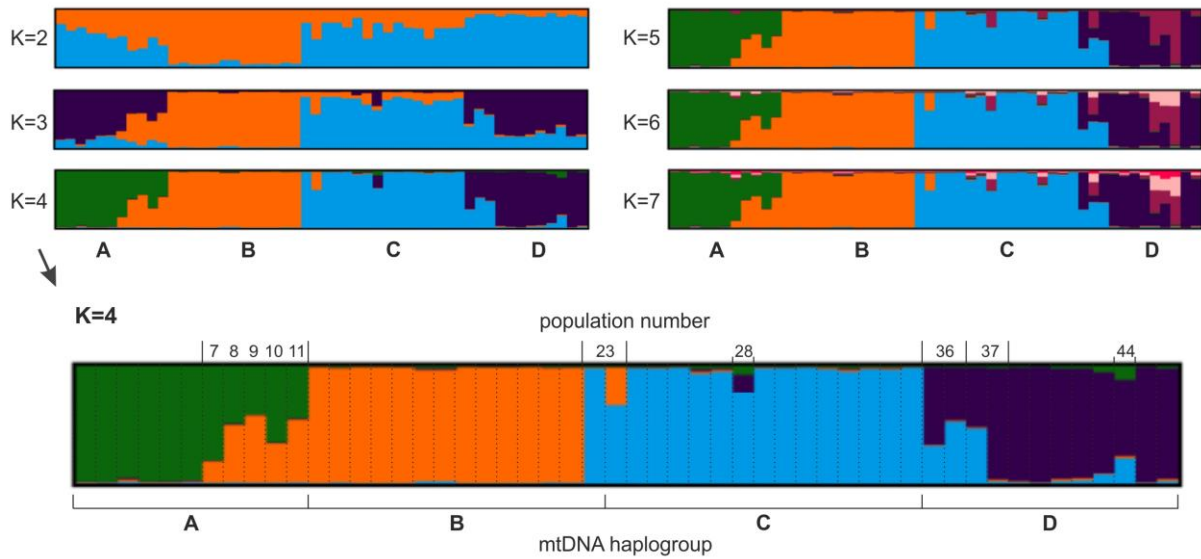


FIGURE 3. Clustering results of Bayesian assignment analyses using Structure, based on nuclear DNA sequences with the number of clusters K ranging from 1 to 7. Each individual is represented as a vertical bar partitioned into K colored segments, whose length is proportional to the individual's estimated group membership coefficient. The enlarged figure shows the results for $K=4$, with population numbers as in Fig. 1 and Supplementary Table 1. Population numbers on the top are shown to highlight individuals with mixed ancestry, and the mitochondrial haplogroup (A-D) for each included individual is shown in the bottom. Individuals in the graph are ordered as in Supplementary Table S1. Note that the comparatively large number of putative hybrids is due to the overrepresentation of populations in the contact zones in our analysis, as compared with Díaz-Rodríguez *et al.* (2015).

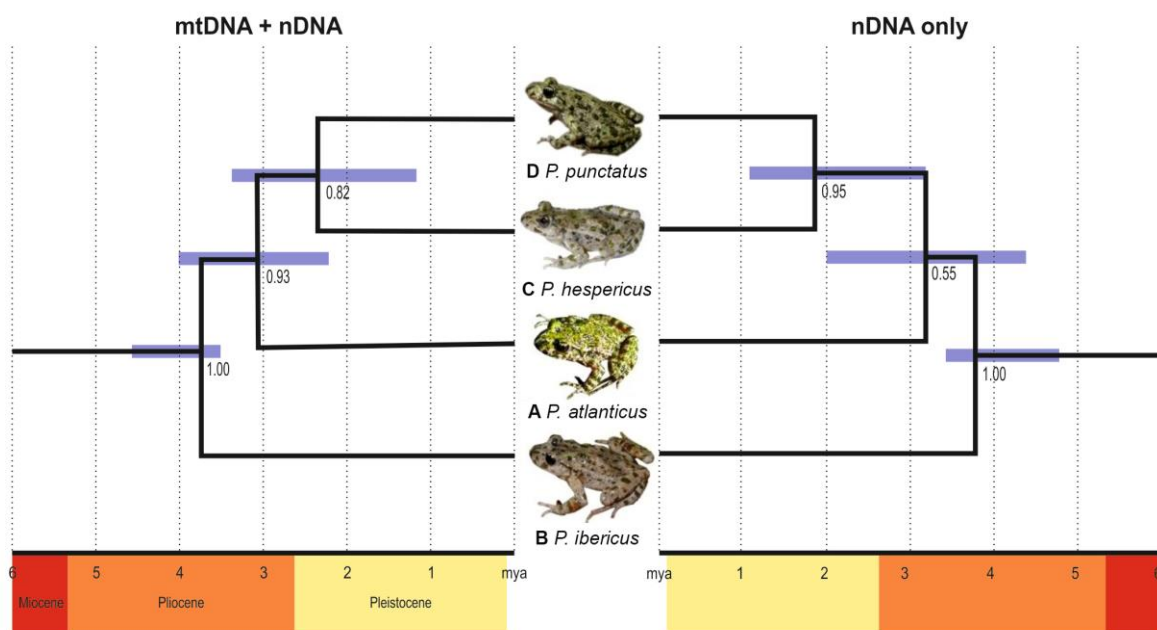
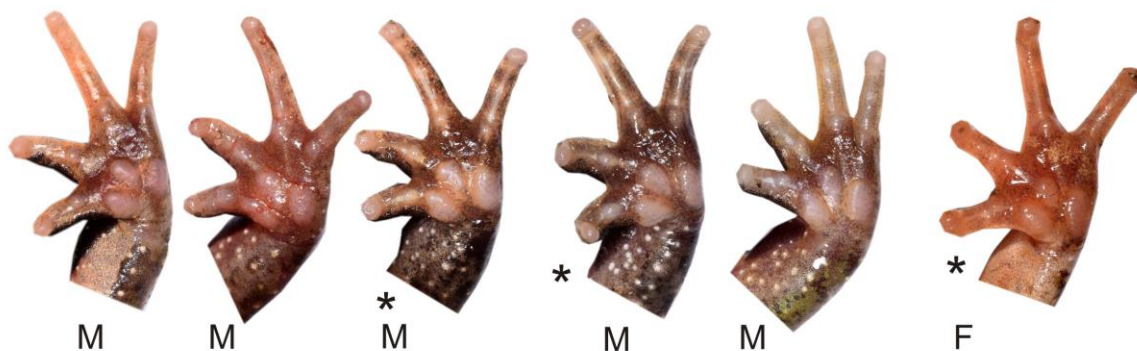


FIGURE 4. Species tree calculated from the analysis of DNA sequences of two mitochondrial and six nuclear gene segments (left), after exclusion of admixed/hybrid samples identified from the nDNA networks in Fig. 2 and Bayesian assignment analyses in Fig. 3. The tree on the right shows the same topology as recovered in a species tree analysis based only on the six nuclear gene segments.

P. punctatus (near Vic)



P. punctatus (near Montpellier)

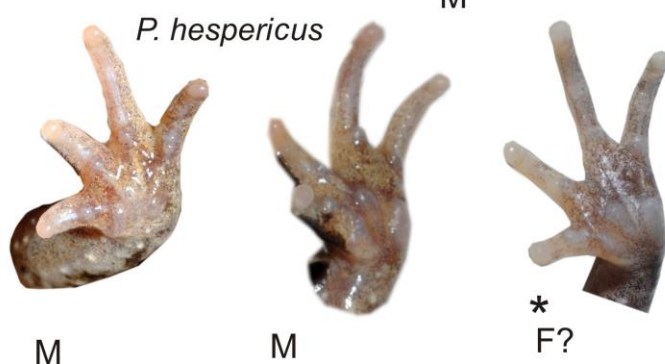
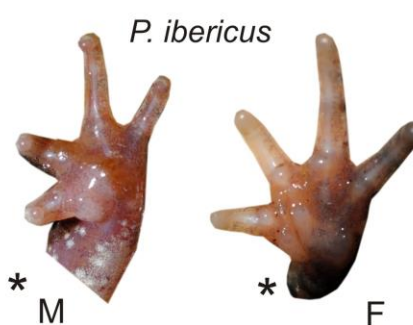
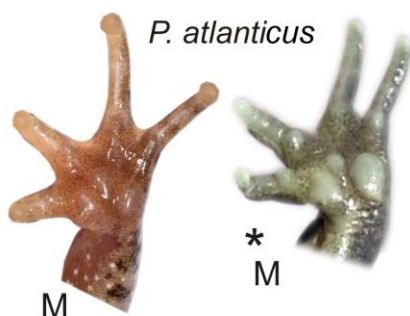
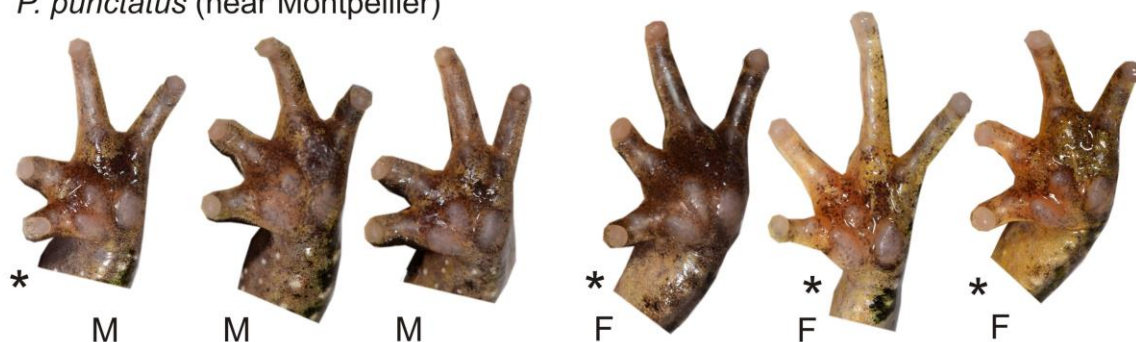


FIGURE 5. Ventral views of specimen hands (palmar surface) of the four western *Pelodytes* lineages. The pictures show variation in the size and arrangement of the subarticular and metacarpal tubercles within species and populations, suggesting that no fully diagnostic interspecific differences in this character exist. All photos from specimens in life. M, male, F, female. Asterisks denote mirrored images. Not to scale.

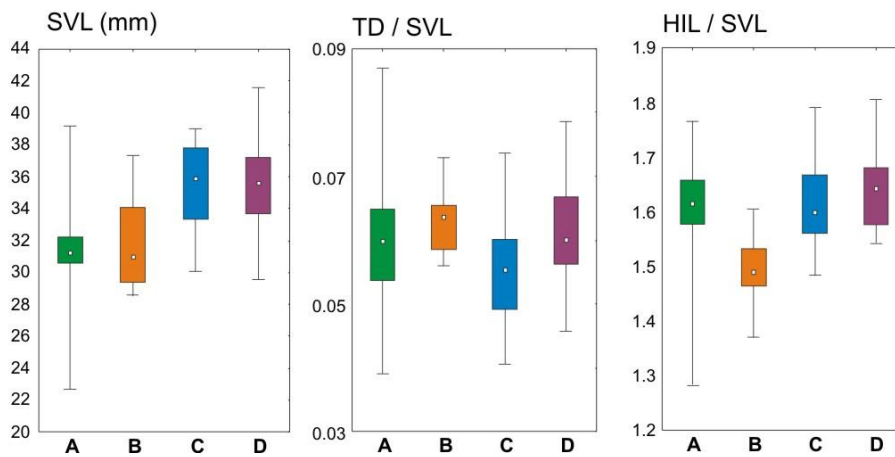
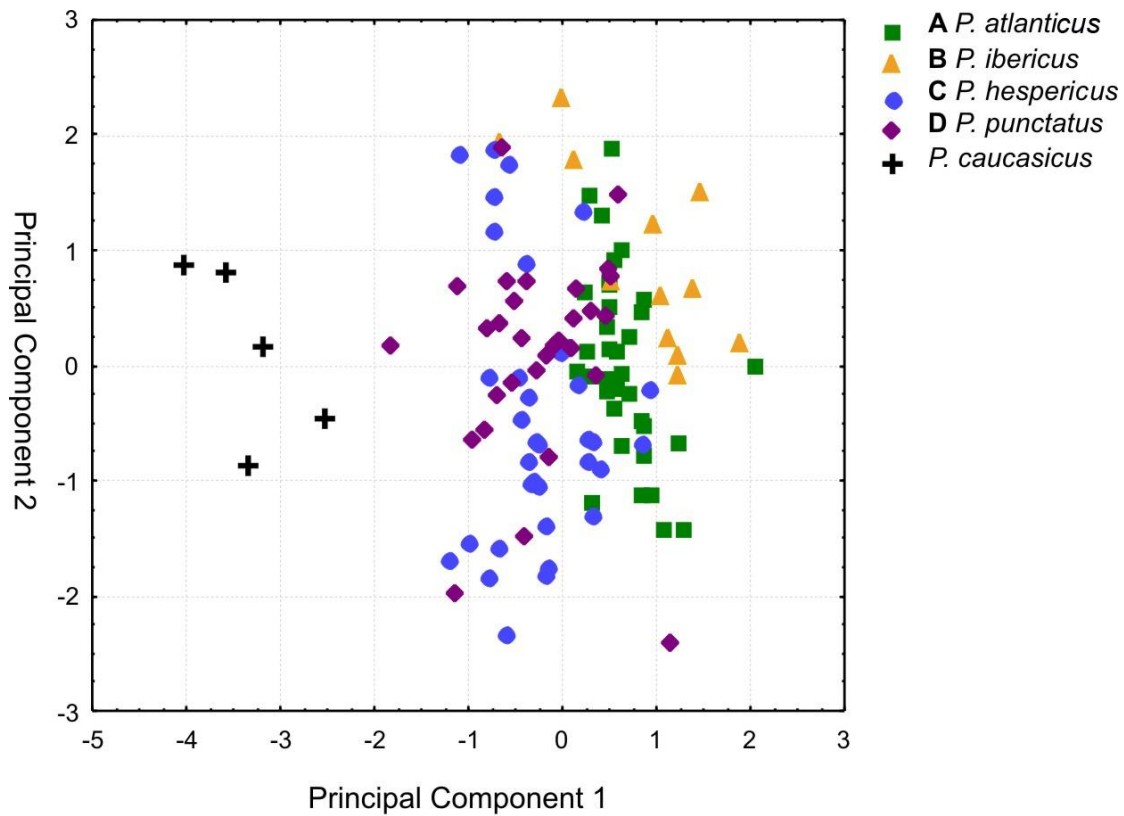


FIGURE 6. Morphometric differentiation among the four western *Pelodytes* lineages. The upper graph is a scatterplot of first and second principal components from a PCA of raw morphometric values in 117 male specimens of *Pelodytes*. Note that PC1 corresponds mostly to body size (Table 4). The lower graphs are boxplots of SVL, relative tympanum diameter and relative tibia length in male *Pelodytes*, with median (dot), 25% percentiles (box) and ranges, illustrating the smaller body size of *P. atlanticus* sp. nov. and *P. ibericus*, and larger tympanum and shorter limbs of *P. ibericus*. All specimens of *P. ibericus*, *P. atlanticus*, and *P. hespericus* were measured by JDR, and specimens of *P. punctatus* were measured by MV.

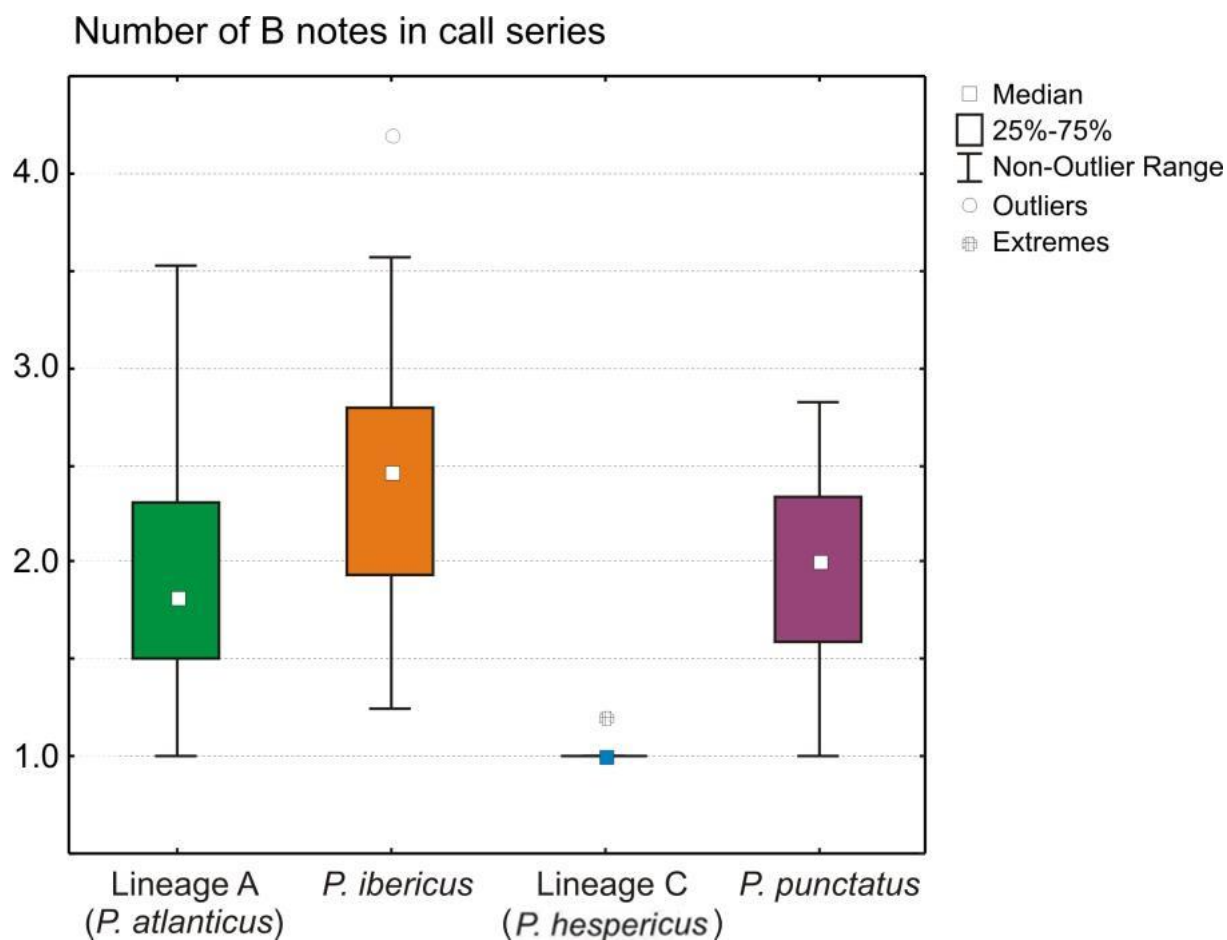
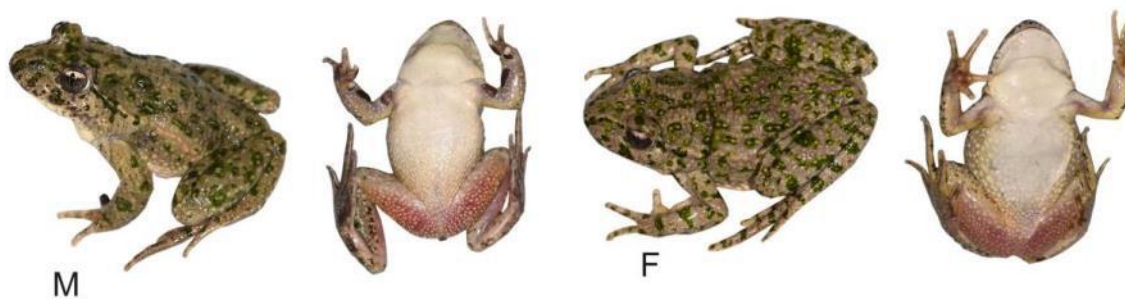


FIGURE 7. Bioacoustic differences between lineages of *Pelodytes* occurring in the Iberian Peninsula. For raw data, see Supplementary Table S3. The boxplot shows the average number of **B** notes per call series, i.e., every call consisting of one **A** note and one or more **B** notes. Average values were first computed per individual, and then summarized across species. Differences are significant between *P. hespericus* sp. nov. and all other species, and between *P. atlanticus* sp. nov. and *P. ibericus* (ANOVA with Tukey's post-hoc test; see Results).

near Montpellier



near Vic (Girona)

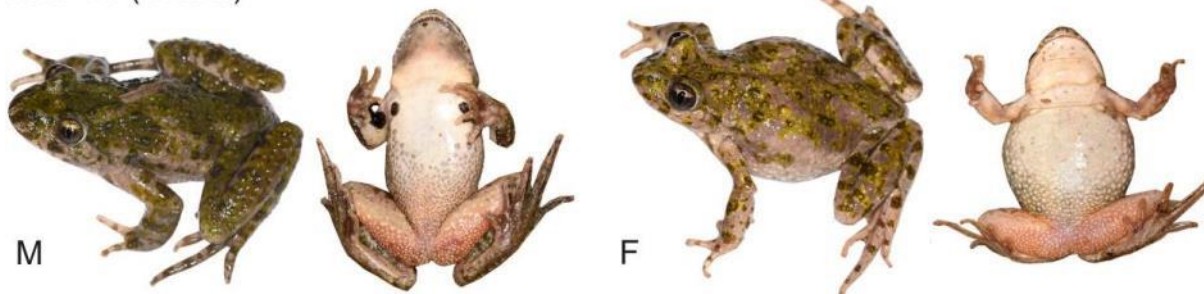


FIGURE 8. Comparative photos of *Pelodytes punctatus* in life. The upper two photos show a male and a female from near Montpellier, France; the lower two pictures show a male and a female from near Vic, Girona, Spain. Specimens not collected. Images not to scale.

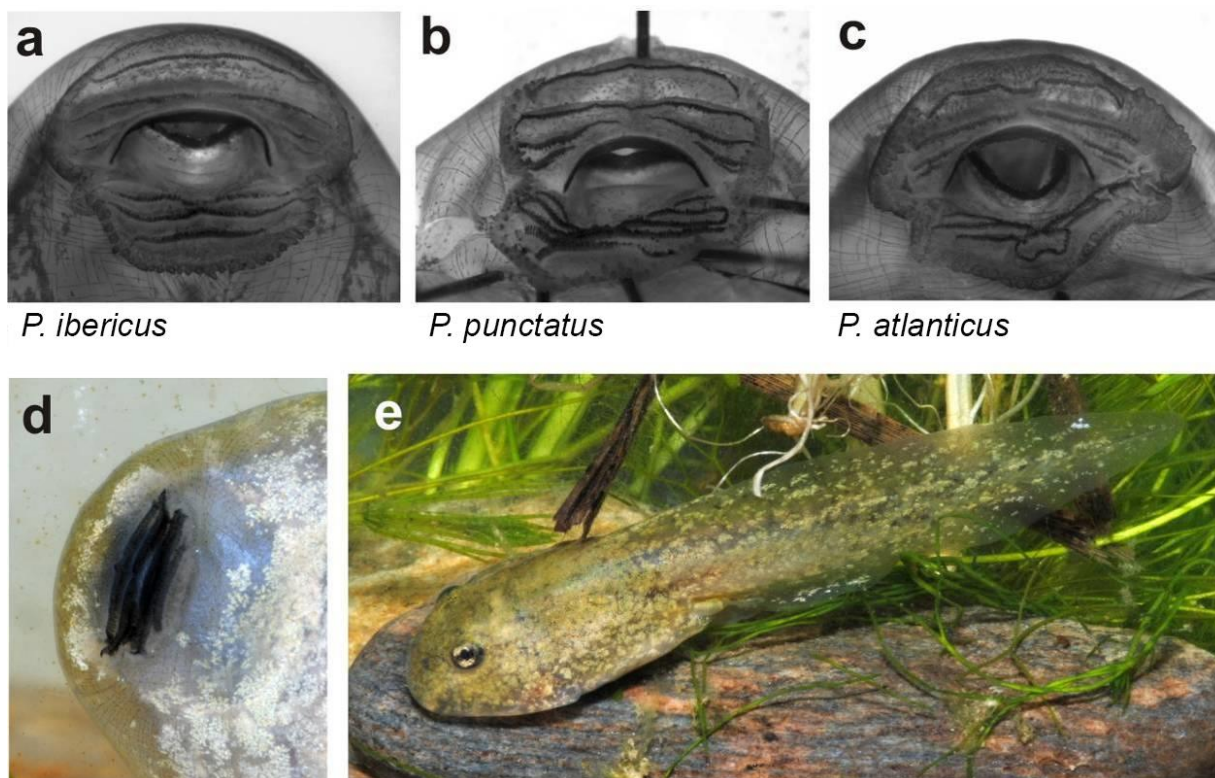


FIGURE 9. a-c, Mouthparts of preserved tadpoles of three species of *Pelodytes*. Note the absence of a central gap in the third anterior labial tooth row in *P. ibericus*. d, mouthpart, and e, lateral view of a living tadpole of *P. ibericus* from near Jerez de la Frontera.



FIGURE 10. Comparative photos of *Pelodytes ibericus* in life, male above, female below, from near Jerez de la Frontera, Spain. Specimens not collected. Images not to scale.



FIGURE 11. (a,b) Dorsal and ventral views of preserved *Pelodytes atlanticus* sp. nov. holotype (male; specimen GLA-03). (c,d) Dorsolateral view of paratype (GLA-02) and holotype (GLA-03) in life. (e-i) dorsolateral, dorsal, and ventral view, as well as ventral view of hand and foot of male paratype ZSM 194/2016. Not to scale.

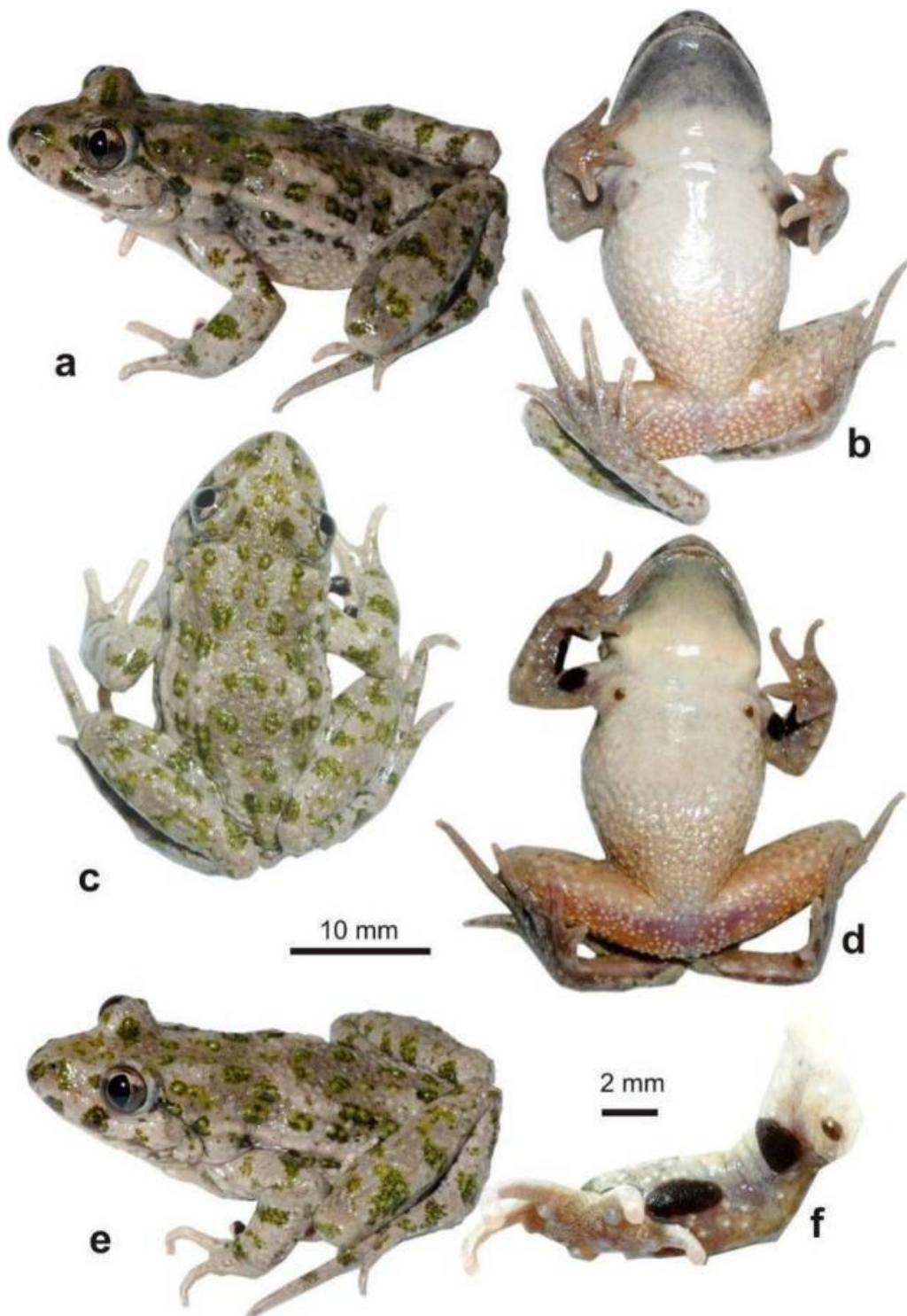


FIGURE 12. Dorsal, ventral and dorsolateral view, and close up of ventral side of forelimb, of living *Pelodytes hespericus* sp. nov.: (a-b) male holotype JDR 2012-1, (c-f); male paratype JDR 2012-2. Not to scale.

Supplementary Materials

Supplementary Table S1. Sample information: ID_POP as in Fig. 1, code, mtDNA haplotype clade, locality, country, latitude and longitude and GenBank accession numbers for newly generated sequences. The ‘nuclear’ field highlights presence of admixture and instances of cyto-nuclear discordance.

ID Pop	Sample Code	mtDNA	nuclear	Locality	Country	Lat	Long	mt-CYB	mt-ND4	KIAA1239	RAG1	B-fibint7	PPP3CAint4	RPL3int5	Cherpint7
1	MIN01	A		Mindelo	Portugal	41.3029	-8.7077	KP166542	KP166909	KX984169	KX984208		KP166142- KP166143		
1	MIN02	A		Mindelo	Portugal	41.3029	-8.7077	KP166543	KP166910						
2	Coimbra	A		Coimbra	Portugal	40.2115	-8.4292	KP166518	KP166885	KX984170	KX984209	KP165852- KP165853	KP166136- KP166137	GU181148	GU181118
3	StVarao	A		Santo Varão, Montemor-o-Velho	Portugal	40.1828	-8.5973	KP166570	KP166937		KX984210				
4	SAL01	A		Salgueiral, Vila-Velha-de-Ródão	Portugal	39.6511	-7.6735	KP166561	KP166928	KX984171	KX984211	KP165862- KP165863			
4	SAL02	A		Salgueiral, Vila-Velha-de-Ródão	Portugal	39.6511	-7.6735	KP166562	KP166929			KP165864- KP165865			
5	Saires	A		Serra de Aire	Portugal	39.5592	-8.5777	KP166559	KP166926	KX984172			KP166148- KP166149		GU181120
5	Saires2	A		Serra de Aire	Portugal	39.5592	-8.5777	KP166560	KP166927						
6	ALJ02	A		Aljezur	Portugal	37.2978	-8.8413	KP166503	KP166870	KX984173		KP165850- KP165851			
6	ALJ03	A		Aljezur	Portugal	37.2978	-8.8413	KP166504	KP166871						
6	TEL07	A		Aljezur	Portugal	37.2978	-8.8413	KP166571	KP166938						
6	TEL08	A		Aljezur	Portugal	37.2978	-8.8413	KP166572	KP166939						
7	Lagos	A	A/B	Lagos	Portugal	37.1244	-8.6458	KP166541	KP166908	KX984174	KX984212	KP165856- KP165857	KP166140- KP166141		

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

8	GRA03	B		Grândola	Portugal	38.1438	-8.5686	KP16643 8	KP16680 5						
8	GRA04	B		Grândola	Portugal	38.1438	-8.5686	KP16643 9	KP16680 6						
8	GRA06	A		Grândola	Portugal	38.1438	-8.5686	KP16652 4	KP16689 1						
8	GRA08	A	A/B	Grândola	Portugal	38.1438	-8.5686	KP16652 5	KP16689 2			KP165854- KP165855	KP16613 8- KP16613 9		
9	OLO18	B		Outeiro do Lobo	Portugal	38.0084	-8.5269	KP16647 0	KP16683 7						
9	OLO20	B		Outeiro do Lobo	Portugal	38.0084	-8.5269	KP16647 1	KP16683 8				KP16619 2- KP16619 3		
9	OLO21	A	A/B	Outeiro do Lobo	Portugal	38.0084	-8.5269	KP16654 6	KP16691 3	KX98417 5	KX98421 3	KP165858- KP165859	KP16614 4- KP16614 5		
10	XAU01	A	A/B	Casa de Xau. Vale de Água	Portugal	37.9177	-8.5486	KP16657 8	KP16694 5	KX98417 6	KX98421 4		KP16615 6- KP16615 7		
10	XAU02	A		Casa de Xau. Vale de Água	Portugal	37.9177	-8.5486	KP16657 9	KP16694 6						
10	XAU04	B		Casa de Xau. Vale de Água	Portugal	37.9177	-8.5486	KP16649 8	KP16686 5						
11	SOL01	B		Soalneira, Campo Redondo	Portugal	37.7585	-8.5110	KP16648 8	KP16685 5						
11	SOL03	A	A/B	Soalneira, Campo Redondo	Portugal	37.7585	-8.5110	KP16656 6	KP16693 3	KX98417 7			KP16619 8- KP16619 9		
11	SOL04	A		Soalneira, Campo Redondo	Portugal	37.7585	-8.5110	KP16656 7	KP16693 4						
12	RMO32	B		Rio de Moinhos, Aljustrel	Portugal	37.8851	-8.1933	KP16648 0	KP16684 7	KX98417 8	KX98421 5	KP165904- KP165905	KP16619 4-		

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

													KP16619 5		
12	RMO33	B		Rio de Moinhos, Aljustrel	Portugal	37.8851	-8.1933	KP16648 1	KP16684 8						
13	CAV01	B		Castro Verde	Portugal	37.7435	-8.0059	KP16642 3	KP16679 0	KX98417 9	KX98421 6				
13	CAV77	B		Castro Verde	Portugal	37.7435	-8.0059	KP16642 4	KP16679 1						
13	CAV78	B		Castro Verde	Portugal	37.7435	-8.0059	KP16642 5	KP16679 2						
14	ODE2023	B		Odeleite	Portugal	37.3410	-7.4872	KP16646 9	KP16683 6	KX98418 0	KX98421 7	KP165876- KP165877	KP16615 8- KP16615 9		
15	ALO02	B		Almada d'Ouro	Portugal	37.3154	-7.4588	KP16641 2	KP16677 9	KX98418 1	KX98421 8	KP165890- KP165891	KP16617 0- KP16617 1		
16	IMSP1	B		Montes Juntos	Portugal	38.5407	-7.3605	KX98415 4		KX98418 2	KX98421 9		KY00054 4- KY00054 5		GU1811 22
17	MVDNA2 805			San Lucar de Bda.	Spain	36.7945	-6.3099				KX98422 0				
17	MVDNA2 806			San Lucar de Bda.	Spain	36.7945	-6.3099				KX98422 1				
18	JER01	B		Jerez	Spain	36.6556	-6.1683	KP16646 1	KP16682 8						
18	JER02	B		Jerez	Spain	36.6556	-6.1683	KP16646 2	KP16682 9						
18	JER12	B		Jerez	Spain	36.6556	-6.1683	KP16646 3	KP16683 0	KX98418 3	KX98422 2	KP165918- KP165919	KP16618 8- KP16618 9		
19	TOB09	B		Toba	Spain	37.9944	-4.9022	KP16649 0	KP16685 7			KP165908- KP165909			
19	TOB10	B		Toba	Spain	37.9944	-4.9022	KP16649 1	KP16685 8	KX98418 4	KX98422 3	KP165920- KP165921			
20	TAR67	B		Taraje	Spain	37.3175	-4.5896	KP16648 9	KP16685 6	KX98418 5		KP165894- KP165895	KP16617 4- KP16617 5		

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

21	ZAF03	B		Zafarraya	Spain	36.9941	-4.1575	KP16649 9	KP16686 6						
21	ZAF04	B		Zafarraya	Spain	36.9941	-4.1575	KP16650 0	KP16686 7						
21	ZAF82	B		Zafarraya	Spain	36.9941	-4.1575	KX98415 5		KX98418 6	KX98422 4	KP165896- KP165897	KP16617 6- KP16617 7		
22	IZN01	B		Iznatoraf	Spain	38.1463	-3.0268	KP16645 8	KP16682 5	KX98418 7	KX98422 5				
22	ISN1	B		Iznatoraf	Spain	38.1476	-3.0300	KP16645 7	KP16682 4	KX98418 8		KP165906- KP165907	KP16619 6- KP16619 7	GU1811 54	
22	IZN228	B		Iznatoraf	Spain	38.1463	-3.0268	KP16645 9	KP16682 6						
22	IZN222	C		Iznatoraf	Spain	38.1463	-3.0268	KP16667 2	KP16703 9						
23	Mest01	B	C	Mestanza	Spain	38.6014	-4.0243	KP16646 5	KP16683 2	KX98418 9	KX98422 6		KP16619 0- KP16619 1	GU1811 52	GU1811 23
23	Mest02	C	B/C	Mestanza	Spain	38.6014	-4.0243	KP16668 3	KP16705 0		KX98422 7	KP165994- KP165995	KP16631 4- KP16631 5		
23	MES01	C		Mestanza	Spain	38.6014	-4.0243	KP16668 0	KP16704 7						
23	MES02	C		Mestanza	Spain	38.6014	-4.0243	KP16668 1	KP16704 8						
23	MES06	C		Mestanza	Spain	38.6014	-4.0243	KP16668 2	KP16704 9						
24	35BED1	C		Bedar	Spain	37.2015	-1.9938	KP16658 0	KP16694 7	KX98419 0		KP166020- KP166021	KP16628 2- KP16628 3	GU1811 53	GU1811 21
24	35BED2	C		Bedar	Spain	37.2015	-1.9938	KP16658 1	KP16694 8						

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

25	49LORC	C		Pozo en Rambla de las Fuentes, Lorca	Spain	37.7580	-1.9778	KP16658 2	KP16694 9	KX98419 1		KP165978- KP165979	KP16628 4- KP16628 5		
26	FBell	C		Fuente Bella	Spain	38.0385	-2.4586	KP16661 4	KP16698 1			KP165986- KP165987			
26	FBell03	C		Fuente Bella	Spain	38.0385	-2.4586	KP16661 5	KP16698 2						
26	FBell04	C		Fuente Bella	Spain	38.0385	-2.4586	KP16661 6	KP16698 3	KX98419 2	KX98422 8	KP165988- KP165989	KP16630 0- KP16630 1	GU1811 50	
27	ACDC01	C		Casas de Carrasco, Santiago de la Espada	Spain	38.1252	-2.6900	KP16658 6	KP16695 3	KX98419 3					
27	Pelhesp			Casas de Carrasco, Santiago de la Espada	Spain	38.1252	-2.6900				KX98422 9				
28	SMA06	C		Santa María	Spain	38.7307	-2.7409	KP16671 9	KP16708 6		KX98423 0	KP166030- KP166031	KP16637 2- KP16637 3		
28	SMA94	C		Santa María	Spain	38.7307	-2.7409	KP16672 0	KP16708 7						
28	SMA95	C		Santa María	Spain	38.7307	-2.7409	KP16672 1	KP16708 8						
29	57Ayor	C		Arroyo Horcajos	Spain	38.9275	-2.5803	KX98415 6			KX98423 1	KP166022- KP166023	KP16628 8- KP16628 9		
30	MAL01	C		Malagón	Spain	39.1806	-3.9133	KP16667 8	KP16704 5	KX98419 4		KP166028- KP166029	KP16631 2- KP16631 3	GU1811 51	
30	MAL02	C		Malagón	Spain	39.1806	-3.9133	KP16667 9	KP16704 6						
31	PP21	C		La Boyeriza, camino de Polvorines	Spain	40.2604	-3.5605	KP16669 8	KP16706 5	KX98419 5	KX98423 2	KP166006- KP166007	KP16633 0- KP16633 1		
31	PP22	C		La Boyeriza, camino de Polvorines	Spain	40.2604	-3.5605	KP16669 9	KP16706 6			KP166096- KP166097			
32	BES01			El Perelló	Spain	40.9167	0.7237			KX98419 6	KX98423 3				

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

32	BES02	C		El Perelló	Spain	40.9167	0.7237	KX98415 7	KX98416 3		KX98423 4				
33	FUEn01	C		Fuendetodos	Spain	41.3560	-0.9550	KX98415 8	KX98416 4	KX98419 7	KX98423 5				
33	FUEn02	C		Fuendetodos	Spain	41.3560	-0.9550	KX98415 9	KX98416 5						
34	ALCu01	C		Alcubierre	Spain	41.7314	-0.4853	KX98416 0	KX98416 6	KX98419 8	KX98423 6				
34	ALCu02	C		Alcubierre	Spain	41.7314	-0.4853	KX98416 1	KX98416 7						
35	BUR02	C		Páramo de Masa	Spain	42.6638	-3.7796	KP16659 8	KP16696 5	KX98419 9	KX98423 7	KP166026- KP166027	KP16629 8- KP16629 9		
36	BAR01	D	C/D	Castellet i la Gornal	Spain	41.2539	1.5925	KP16673 4	KP16710 1	KX98420 0		KP166112- KP166113	KP16638 2- KP16638 3		
36	BAR02	D	C/D	Castellet i la Gornal	Spain	41.2539	1.5925	KP16673 5	KP16710 2	KX98420 1			KP16638 4- KP16638 5	GU1811 55	GU1811 25
37	GAR01	D	C/D	El Garraf	Spain	41.2736	1.8370	KP16674 1	KP16710 8			KP165990- KP165991	KP16630 4- KP16630 5		
37	GAR02	D	D	El Garraf	Spain	41.2736	1.8370	KP16674 2	KP16710 9			KP166074- KP166075	KP16630 2- KP16630 3		
38	BRU06	D		El Brull (Osona)	Spain	41.8028	2.2636	KP16673 6	KP16710 3			KP165984- KP165985	KP16629 6- KP16629 7		
38	BRU08	D		El Brull (Osona)	Spain	41.8028	2.2636	KP16673 7	KP16710 4						
38	BRU28	D		El Brull (Osona)	Spain	41.8028	2.2636	KP16673 8	KP16710 5			KP166072- KP166073	KP16629 4-		

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

													KP16629 5		
39	SOS04	D		Solsona	Spain	42.0984	1.6469	KP16676 5	KP16713 2						
39	SOS05	D		Solsona	Spain	42.0984	1.6469	KP16676 6	KP16713 3	KX98420 2	KX98423 8	KP166032- KP166033	KP16635 6- KP16635 7		
39	SOS06	D		Solsona	Spain	42.0984	1.6469	KP16676 7	KP16713 4						
40	LLA01	D		Llança	Spain	42.3745	3.1553	KP16675 1	KP16711 8			KP166116- KP166117	KP16630 6- KP16630 7		
40	LLA02	D		Llança	Spain	42.3745	3.1553	KP16675 2	KP16711 9	KX98420 3					
41	Devois	D		Mare de Devois	France	43.5652	3.6944	KP16674 0	KP16710 7	KX98420 4		KP166114- KP166115	KP16638 8- KP16638 9		
42	Pataris	D		Mare de Pataris	France	43.5694	3.6952	KP16675 5	KP16712 2	KX98420 5		KP166118- KP166119	KP16639 2- KP16639 3	GU1811 56	GU1811 24
43	SAV02	D		Savona	Italy	44.1833	8.3667	KP16675 8	KP16712 5						
44	SBC01	D		Saint-Bonnet-en- Champsaur	France	44.6828	6.0777	KP16676 1	KP16712 8				KP16639 8- KP16639 9		
44	SBC02	D		Saint-Bonnet-en- Champsaur	France	44.6828	6.0777	KP16676 2	KP16712 9						
45	AMB01	D		Ambleteuse	France	50.7994	1.6186	KP16673 1	KP16709 8	KX98420 6	KX98423 9	KP166110- KP166111	KP16638 0- KP16638 1		
45	AMB02	D		Ambleteuse	France	50.7994	1.6186	KX98416 2	KX98416 8	KX98420 7					
45	AMB03	D		Ambleteuse	France	50.7994	1.6186	KP16673 2	KP16709 9						
45	AMB04	D		Ambleteuse	France	50.7994	1.6186	KP16673 3	KP16710 0						

Supplementary Table S2. Original morphometric measurements for species of *Pelodytes*. Abbreviations of variables as in Materials and Methods. JDR, J. Díaz-Rodríguez; MV, M. Vences. To minimize the observer effect, for morphometric analysis we only used specimens of *P. atlanticus*, *P. hespericus* and *P. ibericus* measured by JDR, and specimens of *P. punctatus* and *P. caucasicus* measured by MV.

Scientific Name	Voucher	Locality	Measured by	Lineage	Sex	SVL	HW	HL	TD	ED	END	NSD	NND	HAL	FORL	HIL	FOL	FOTL	TIL
Males																			
<i>P. atlanticus</i>	ZSM 1/2011	Nives, north of Portimão	JDR	A	M	37.8	13.2	13.4	2.4	4.0	3.6	3.0	3.1	9.4	20.5	54.4	17.2	25.8	16.5
<i>P. atlanticus</i>	ZSM 1201/2012	1.6 km NNE Barão de São Miguel	JDR	A	M	30.8	10.7	11.0	2.0	4.0	3.0	2.6	3.0	8.0	18.6	50.3	15.8	24.5	14.7
<i>P. atlanticus</i>	MB 110	Cacém	JDR	A	M	29.4	10.1	10.3	1.9	2.5	3.0	2.3	2.2	7.8	18.1	44.8	16.0	23.0	14.7
<i>P. atlanticus</i>	MB 112	Cascais	JDR	A	M	31.7	11.9	11.2	2.5	4.3	2.7	2.6	2.5	8.8	20.0	51.7	17.0	25.2	15.7
<i>P. atlanticus</i>	MB 112	Cascais	JDR	A	M	30.6	11.2	10.7	1.9	3.7	3.0	2.2	2.3	8.7	20.5	48.8	16.1	24.1	16.0
<i>P. atlanticus</i>	MB 112	Cascais	JDR	A	M	29.3	11.2	10.5	1.9	3.8	3.1	2.3	2.4	9.0	20.7	50.5	16.0	24.2	15.8
<i>P. atlanticus</i>	MB 113	Cascais	JDR	A	M	27.8	9.2	9.9	1.6	3.4	2.5	2.1	1.9	8.4	20.5	48.4	15.0	23.6	16.0
<i>P. atlanticus</i>	MB04-113	Pedreira – Benfica	JDR	A	M	31.2	12.0	11.5	1.6	3.7	2.7	2.3	2.2	8.8	20.7	51.4	15.8	23.8	16.4
<i>P. atlanticus</i>	GLA01 - JDR 2015 (paratype)	Reserva de Mindelo – Porto	JDR	A	M	33.5	12.2	11.5	1.9	3.6	2.8	2.8	2.6	9.3	20.5	54.0	17.5	26.5	17.1
<i>P. atlanticus</i>	GLA02 - JDR 2015 (paratype)	Reserva de Mindelo – Porto	JDR	A	M	31.0	11.1	10.5	2.0	3.7	2.8	2.8	2.8	8.7	19.4	49.0	16.5	24.7	15.6
<i>P. atlanticus</i>	GLA03 - JDR 2015 (holotype)	Reserva de Mindelo – Porto	JDR	A	M	33.0	11.6	11.0	1.9	3.6	2.7	2.6	2.3	9.0	20.0	52.6	16.6	25.4	16.5
<i>P. atlanticus</i>	MB 114	Cascais	JDR	A	M	30.1	10.9	10.7	1.8	3.6	2.6	2.2	2.3	9.0	21.0	49.8	15.6	23.9	15.2
<i>P. atlanticus</i>	MB 115	Cascais	JDR	A	M	30.1	10.3	10.7	1.7	3.6	2.8	2.0	2.0	8.7	21.1	49.6	15.6	24.4	15.8

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>P. atlanticus</i>	MB 116	Cascais	JDR	A	M	30.1	10.9	10.6	1.8	3.6	2.7	1.9	2.1	8.5	20.9	51.7	17.0	25.5	15.8
<i>P. atlanticus</i>	MB 118	Cascais	JDR	A	M	30.6	10.2	10.4	2.0	3.6	2.5	2.3	2.1	8.9	21.0	50.6	16.1	24.6	15.4
<i>P. atlanticus</i>	MB 113	Benfica, Pedreira (Cantera en Benfica)	JDR	A	M	30.7	11.3	10.6	2.0	3.1	2.7	2.2	2.9	7.9	19.6	48.7	19.8	23.4	15.2
<i>P. atlanticus</i>	MB 106	Benfica, Pedreira (Cantera en Benfica)	JDR	A	M	31.0	11.6	11.7	2.1	4.0	2.8	2.2	2.2	8.9	21.3	51.0	16.8	25.2	16.2
<i>P. atlanticus</i>	MB 107	Benfica, Pedreira (Cantera en Benfica)	JDR	A	M	31.3	11.1	11.0	2.0	3.8	2.3	2.2	2.7	9.0	22.3	52.7	16.1	24.7	16.2
<i>P. atlanticus</i>	MB 110	Benfica, Pedreira (Cantera en Benfica)	JDR	A	M	30.8	11.6	11.5	1.4	3.6	2.3	2.0	1.8	8.4	20.8	48.8	15.2	22.7	15.2
<i>P. atlanticus</i>	MB 111	Benfica, Pedreira (Cantera en Benfica)	JDR	A	M	30.8	11.7	10.3	1.2	3.9	2.5	2.4	2.3	8.8	20.2	49.9	15.5	24.0	15.7
<i>P. atlanticus</i>	MB 112	Benfica, Pedreira (Cantera en Benfica)	JDR	A	M	32.6	10.7	11.2	1.8	3.8	2.9	2.1	2.5	9.4	22.9	55.5	17.6	27.2	17.9
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C27	Vila do Bispo	JDR	A	M	31.3	12.1	12.4	1.9	3.9	3.4	2.5	2.7	8.5	17.0	51.9	12.8	25.0	16.7
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C28	Vila do Bispo	JDR	A	M	22.7	9.3	9.7	1.4	2.9	2.4	2.1	2.2	7.2	15.2	40.0	12.7	20.3	13.3
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C29	Vila do Bispo	JDR	A	M	31.5	10.7	12.6	1.8	3.4	2.9	2.5	2.7	8.9	21.5	49.6	15.2	24.5	15.7
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C30	Vila do Bispo	JDR	A	M	30.6	11.4	12.0	1.8	3.8	3.0	2.4	2.8	8.5	19.8	49.5	16.3	23.8	16.0
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C31	Vila do Bispo	JDR	A	M	33.4	12.2	11.5	2.0	3.7	3.2	2.4	2.9	8.5	20.8	54.0	16.5	24.9	16.4
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C33	Vila do Bispo	JDR	A	M	32.1	11.0	10.9	1.7	3.4	2.7	2.4	2.8	7.9	20.0	47.2	15.4	23.1	15.1
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C34	Vila do Bispo	JDR	A	M	32.5	11.5	12.0	2.0	3.6	2.9	2.3	2.6	8.0	20.0	50.8	17.0	25.1	16.4
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C35	Vila do Bispo	JDR	A	M	32.2	11.4	11.2	2.8	3.8	2.7	2.1	2.8	8.5	19.5	48.6	15.7	24.0	15.4
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C36	Vila do Bispo	JDR	A	M	39.2	11.7	10.9	1.7	3.6	3.3	1.9	2.5	8.1	20.5	50.2	15.2	24.3	16.1
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C37	Vila do Bispo	JDR	A	M	34.0	12.2	11.9	1.5	4.0	2.8	2.3	2.7	8.6	20.3	54.2	16.5	25.9	17.2
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C39	Vila do Bispo	JDR	A	M	31.0	11.4	11.6	2.0	4.0	2.9	2.3	2.6	8.2	19.0	48.6	15.7	22.6	16.3
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C41	Vila do Bispo	JDR	A	M	31.5	11.9	11.8	2.0	3.8	2.8	2.5	2.5	8.7	20.0	52.0	16.3	29.6	17.2

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>atlanticus</i>																				
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C42	Vila do Bispo	JDR	A	M	33.0	11.5	10.8	1.8	3.8	2.8	2.4	2.8	8.8	19.5	49.0	17.1	24.7	16.4	
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C43	Vila do Bispo	JDR	A	M	31.3	11.9	11.0	1.6	4.1	2.9	2.1	2.5	8.5	20.8	49.4	16.8	24.0	16.7	
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C44	Vila do Bispo	JDR	A	M	32.2	11.0	11.0	1.5	3.6	2.6	2.5	2.7	8.0	17.5	48.8	15.5	23.0	15.7	
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C44	Vila do Bispo	JDR	A	M	30.5	11.2	10.7	2.4	3.8	2.7	2.5	2.5	8.9	21.4	50.7	15.6	24.6	16.0	
<i>P. ibericus</i>	EBD 29822	Paratype. Estación Biologica de Doñana. Huelva	JDR	B	M	33.4	11.5	11.6	2.0	4.0	2.9	2.1	2.6	8.7	19.9	50.4	15.5	24.5	15.4	
<i>P. ibericus</i>	MB (Lisboa Museum - EBD 391)	Paratype. Estación Biológica de Doñana	JDR	B	M	30.0	11.1	10.1	1.9	3.2	2.6	2.2	2.5	7.6	19.0	47.0	14.7	22.9	14.9	
<i>P. ibericus</i>	EBD 596	Sevilla: Coripe	JDR	B	M	35.4	12.2	12.2	2.3	4.1	3.2	2.2	3.5	9.1	19.3	52.3	17.3	25.9	15.1	
<i>P. ibericus</i>	EBD 586	Sierra de Algodonales. Cádiz	JDR	B	M	34.6	12.5	12.5	2.0	4.0	3.0	2.3	3.3	8.9	19.1	52.4	16.5	25.0	15.6	
<i>P. ibericus</i>	EBD 590	Sierra de Algodonales. Cádiz	JDR	B	M	37.2	13.3	13.0	2.4	4.7	3.2	2.8	3.1	9.7	22.4	57.7	18.0	28.0	16.8	
<i>P. ibericus</i>	MNCN23664	Doñana	JDR	B	M	28.5	9.9	10.0	1.9	3.4	2.5	2.2	2.8	7.1	16.7	41.4	14.0	21.1	13.6	
<i>P. ibericus</i>	MNCN23665	Doñana	JDR	B	M	29.2	11.2	10.4	1.9	3.6	2.8	2.0	2.6	7.6	17.8	46.9	15.0	22.8	15.7	
<i>P. ibericus</i>	MNCN23662	Holotype. Doñana	JDR	B	M	29.3	10.4	10.3	1.6	3.4	2.9	2.1	2.4	7.5	15.0	44.1	14.0	21.8	14.3	
<i>P. ibericus</i>	MNCN24259	Cádiz	JDR	B	M	32.1	10.7	10.5	1.9	2.9	2.6	2.1	2.3	7.4	18.9	46.9	13.8	21.7	15.0	
<i>P. ibericus</i>	MNCN2718	Sanlúcar-Jerez	JDR	B	M	28.6	9.6	10.0	1.7	2.9	2.6	2.1	2.1	6.6	16.5	39.2	12.7	18.5	12.9	
<i>P. ibericus</i>	MAR01_A360	Ctra. A360. Marchena, Sevilla.	JDR	B	M	31.6	11.2	10.9	2.3	3.5	2.6	2.1	2.6	7.7	19.7	46.2	14.3	22.2	13.9	
<i>P. ibericus</i>	CAMP04	La Campana, Sevilla.	JDR	B	M	30.0	11.2	11.1	2.0	2.8	2.5	2.0	2.5	7.4	19.6	44.5	14.4	21.7	14.4	
<i>P. ibericus</i>	ZCMV 14096	near Jerez de la Frontera	JDR	B	M	36.3	13.0	12.5	2.6	4.0	3.3	3.0	3.0	10.0	22.0	55.0	18.2	25.0	16.4	
<i>P. ibericus</i>	CM 52151-B	near Medina-Sidonia	MV	B	M	31.0	11.2	10.9	2.3	3.2	3.1	2.1	2.9	8.1	18.0	46.0	14.5	22.6	13.7	
<i>P. ibericus</i>	CM 52151-C	near Medina-Sidonia	MV	B	M	30.4	10.8	11.1	2.4	3.3	3.0	2.3	2.7	7.9	16.6	46.7	15.8	23.5	13.9	
<i>P. ibericus</i>	CM 52238	Rota-Chipiona	MV	B	M	32.4	10.4	10.3	2.2	3.1	3.0	1.8	3.2	7.6	17.5	44.4	14.8	22.5	13.6	

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>P. ibericus</i>	CM 52238-B	Rota-Chipiona	MV	B	M	31.2	11.1	10.5	2.1	3.1	2.9	2.2	2.8	7.4	16.7	43.1	13.5	20.9	13.5
<i>P. ibericus</i>	CM 52238-C	Rota-Chipiona	MV	B	M	32.4	10.5	10.5	2.1	3.0	2.9	1.8	2.7	7.3	15.3	43.8	14.4	21.9	13.1
<i>P. ibericus</i>	CM 52238-D	Rota-Chipiona	MV	B	M	30.3	10.6	10.4	2.1	3.2	2.8	2.1	3.0	7.9	17.2	46.1	15.2	22.7	13.9
<i>P. ibericus</i>	CM 52238-E	Rota-Chipiona	MV	B	M	31.3	11.8	11.1	2.1	3.4	3.0	2.3	3.2	7.8	17.3	47.4	14.3	22.4	14.3
<i>P. ibericus</i>	CM 52238-F	Rota-Chipiona	MV	B	M	29.1	10.0	10.2	1.9	3.0	3.0	2.2	2.6	7.2	16.4	41.8	12.6	19.7	13.0
<i>P. ibericus</i>	CM 52238-G	Rota-Chipiona	MV	B	M	28.7	10.4	10.3	1.9	3.1	3.1	2.0	2.5	7.2	15.6	40.7	13.2	19.6	13.3
<i>P. ibericus</i>	CM 52238-I	Rota-Chipiona	MV	B	M	26.8	9.9	9.6	1.8	2.7	2.7	1.7	2.6	6.3	13.9	38.5	12.3	18.0	12.0
<i>P. ibericus</i>	CM 52449-D	Rota-Chipiona	MV	B	M	31.7	10.3	10.3	2.3	3.1	3.4	2.2	2.8	7.3	15.9	43.1	14.1	21.1	13.2
<i>P. ibericus</i>	CM 52449-H	Rota-Chipiona	MV	B	M	28.8	9.7	9.8	1.9	2.9	2.5	1.9	3.1	6.7	15.1	42.4	13.2	19.8	12.5
<i>P. ibericus</i>	CM 52521-D	Trebujena-Jerez	MV	B	M	29.3	10.6	10.0	2.3	3.1	3.0	2.2	3.1	7.5	15.8	42.0	13.8	20.7	12.4
<i>P. ibericus</i>	CM 54288	19 km from Puerto Real	MV	B	M	30.6	11.4	10.9	2.1	3.2	2.8	2.2	3.2	8.0	18.1	50.1	15.9	23.6	14.3
<i>P. ibericus</i>	CM 54288-B	19 km from Puerto Real	MV	B	M	31.6	10.6	10.5	2.2	3.3	3.2	2.1	3.1	7.8	18.6	46.1	14.9	22.0	13.8
<i>P. ibericus</i>	CM 54288-C	19 km from Puerto Real	MV	B	M	29.6	10.9	10.9	2.0	3.5	2.7	2.0	2.9	7.7	17.2	46.3	15.0	22.7	14.2
<i>P. ibericus</i>	CM 54288-F	19 km from Puerto Real	MV	B	M	32.6	11.2	11.0	2.2	3.3	2.9	2.1	2.9	8.7	19.2	47.7	15.8	24.2	14.4
<i>P. ibericus</i>	CM 54288-L	19 km from Puerto Real	MV	B	M	34.0	12.4	11.8	2.2	3.7	2.9	2.3	3.1	8.4	19.1	49.0	16.1	24.2	15.5
<i>P. hespericus</i>	JDR 2012-1	Artunido a Casas de Carrasco. Sierra de Segura	JDR	C	M	36.0	13.3	13.0	2.1	3.8	4.0	2.4	3.2	9.9	20.9	56.3	16.7	26.4	17.2
<i>P. hespericus</i>	JDR 2012-2	Artunido a Casas de Carrasco. Sierra de Segura (holotype)	JDR	C	M	36.6	12.7	13.3	2.7	4.0	4.3	3.0	3.6	10.6	23.2	61.6	18.4	28.5	18.4
<i>P. hespericus</i>	EBD 28174	Soria	JDR	C	M	37.2	12.9	13.1	2.4	4.1	4.0	3.0	3.1	9.9	22.3	58.2	17.8	27.9	16.8
<i>P. hespericus</i>	EBD 28172	Soria	JDR	C	M	34.2	12.3	12.4	1.7	4.0	3.4	2.0	3.0	9.9	21.2	54.1	16.7	26.1	16.4
<i>P. hespericus</i>	EBD 28169	Soria	JDR	C	M	38.1	12.9	13.3	2.5	4.1	3.0	2.7	3.2	10.6	22.9	59.6	18.6	28.7	18.0
<i>P. hespericus</i>	EBD 28170	Soria	JDR	C	M	37.9	13.1	13.3	2.1	4.3	3.4	2.5	3.6	10.1	22.3	57.5	17.5	26.0	16.8
<i>P. hespericus</i>	EBD 28171	Soria	JDR	C	M	38.1	13.0	13.7	2.3	4.4	3.5	3.0	3.2	9.8	21.5	58.1	18.0	27.5	17.3
<i>P.</i>	EBD 28173	Soria	JDR	C	M	33.3	12.3	12.1	2.0	4.2	3.4	2.3	2.9	8.8	20.4	52.0	15.3	24.2	15.4

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN670	Valencia	JDR	C	M	38.3	13.3	12.2	2.2	3.5	3.3	2.3	2.7	10.7	26.5	63.9	20.3	30.2	20.3	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN672	Valencia	JDR	C	M	34.3	12.4	11.5	2.1	3.2	3.3	2.4	2.4	9.6	25.1	59.0	18.5	28.4	18.4	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN684	Valencia	JDR	C	M	36.0	13.0	12.1	2.2	3.5	3.3	2.6	2.3	9.9	24.5	57.5	18.1	27.8	17.2	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN2720	Valencia	JDR	C	M	36.7	12.6	12.2	2.0	3.8	3.5	2.3	2.7	10.3	23.3	57.3	18.6	28.5	18.4	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN2721	Valencia	JDR	C	M	39.0	14.9	13.6	1.6	4.1	3.8	2.8	2.9	10.8	27.3	63.0	20.8	30.8	20.3	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN2722	Valencia	JDR	C	M	33.2	12.8	11.3	2.0	3.6	3.4	3.0	3.2	10.4	25.0	55.4	19.2	27.5	18.2	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN2723	Valencia	JDR	C	M	34.4	12.3	12.2	1.9	3.7	3.3	2.5	2.9	9.6	22.7	53.2	17.1	25.3	17.1	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN2724	Valencia	JDR	C	M	33.5	12.0	11.7	1.9	3.6	3.9	2.6	2.9	9.7	22.5	57.7	18.2	28.1	18.6	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN2725	Valencia	JDR	C	M	36.2	12.9	12.3	1.7	3.8	3.3	3.1	2.7	10.0	23.1	57.4	18.6	28.2	18.2	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN25032	La Rioja	JDR	C	M	38.2	13.7	13.1	1.8	3.7	3.8	3.1	3.1	10.1	22.6	59.0	18.3	28.0	19.7	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN25034	La Rioja	JDR	C	M	32.4	12.3	11.0	1.6	3.2	3.1	2.6	2.6	9.0	22.3	51.8	16.6	24.9	16.8	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN41414	Masa, Burgos	JDR	C	M	37.1	13.0	12.9	1.8	3.6	3.6	2.2	2.6	10.6	27.4	61.4	18.6	29.5	19.7	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN41416	Masa, Burgos	JDR	C	M	33.4	12.3	12.2	2.3	3.8	3.3	2.7	2.7	9.4	24.4	59.3	17.8	28.3	19.0	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN25020	Teruel	JDR	C	M	32.5	11.3	11.0	1.4	3.5	3.3	1.9	2.5	8.1	20.7	48.2	14.3	23.3	15.9	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN41697	Brea de Tajo	JDR	C	M	33.3	12.7	11.6	1.8	3.8	3.4	2.3	2.4	9.9	25.9	58.8	17.9	27.9	18.6	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN41698	Corpa	JDR	C	M	30.7	10.9	10.2	1.4	3.7	3.2	2.2	2.5	8.2	19.7	47.6	14.9	22.7	15.3	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN377	Almodóvar del	JDR	C	M	38.0	12.8	12.1	2.0	3.8	3.3	2.8	2.4	10.6	26.6	62.1	19.3	29.4	19.1	

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>hespericus</i>		Campo, Ciudad Real																		
<i>P.</i>	MNCN24490	Merindad de Rio	JDR	C	M	32.9	11.9	11.2	1.6	3.6	3.4	2.2	2.4	9.0	23.0	53.5	16.9	25.4	17.2	
<i>hespericus</i>		Ubierna, Burgos																		
<i>P.</i>	MNCN25022	Palencia	JDR	C	M	37.2	12.5	12.6	1.8	3.8	3.5	2.3	2.7	9.9	24.0	56.8	18.1	27.7	18.7	
<i>hespericus</i>		La Rioja																		
<i>P.</i>	MNCN25026	La Rioja	JDR	C	M	37.9	12.7	12.3	1.9	4.0	3.3	2.4	2.5	9.5	23.8	57.1	17.3	27.5	18.5	
<i>hespericus</i>		La Rioja																		
<i>P.</i>	MNCN25023	La Rioja	JDR	C	M	34.1	12.7	12.1	1.9	3.8	3.1	2.6	2.6	10.5	24.9	56.9	17.7	27.8	18.7	
<i>hespericus</i>		La Rioja																		
<i>P.</i>	MNCN25024	La Rioja	JDR	C	M	33.1	11.5	11.4	2.0	3.9	3.2	2.4	2.1	9.3	22.4	52.1	15.6	24.9	17.3	
<i>hespericus</i>		La Rioja																		
<i>P.</i>	MNCN25028	La Rioja	JDR	C	M	36.5	12.8	11.8	1.6	3.5	3.2	2.4	2.8	9.4	24.3	59.6	17.2	27.9	18.8	
<i>hespericus</i>		La Rioja																		
<i>P.</i>	MNCN25029	La Rioja	JDR	C	M	33.7	11.4	11.6	2.0	3.6	3.1	2.4	2.3	9.0	22.2	54.0	16.7	25.4	17.6	
<i>hespericus</i>		La Rioja																		
<i>P.</i>	MNCN25025	La Rioja	JDR	C	M	33.6	12.1	11.3	2.0	3.7	3.2	2.4	2.7	9.6	21.6	54.3	16.4	26.3	17.0	
<i>hespericus</i>		Castellón																		
<i>P.</i>	MNCN20783	Castellón	JDR	C	M	30.1	11.1	11.2	1.8	4.0	2.8	2.4	2.5	9.5	23.1	53.9	17.7	26.3	18.3	
<i>hespericus</i>		Valencia																		
<i>P.</i>	MNCN673	Valencia	JDR	C	M	37.9	13.0	12.8	2.1	3.7	3.8	2.7	2.8	10.8	27.2	65.0	20.1	31.0	19.7	
<i>hespericus</i>		Serra de Busa. Solsona																		
<i>P.</i>	JDR 2012-7	Serra de Busa. Solsona	JDR	D	M	37.0	13.7	13.6	2.5	3.0	3.5	2.8	2.6	11.0	27.4	66.9	20.5	32.3	20.6	
<i>punctatus</i>		El Brull. Osona																		
<i>P.</i>	JDR 2012-8	El Brull. Osona	JDR	D	M	36.5	12.7	12.6	2.2	3.0	3.3	2.2	2.8	9.4	25.0	62.0	18.5	28.9	19.6	
<i>punctatus</i>		Berga, Barcelona																		
<i>P.</i>	MNCN42956	Berga, Barcelona	MV	D	M	29.6	10.6	10.9	1.5	2.9	3.2	1.7	1.7	8.2	20.2	49.2	15.8	24.6	15.2	
<i>punctatus</i>		Southern France																		
<i>P.</i>	ZFMK 45091	Southern France	MV	D	M	37.4	15.0	12.5	2.0	4.5	3.0	2.0	3.0	9.3	21.5	59.0	18.0	27.5	17.2	
<i>punctatus</i>		Southern France																		
<i>P.</i>	ZFMK 45095	Southern France	MV	D	M	37.1	12.5	12.4	2.6	4.5	3.5	3.0	3.0	9.3	22.7	58.1	18.4	27.8	17.0	
<i>punctatus</i>		Southern France																		
<i>P.</i>	ZFMK 45088	Southern France	MV	D	M	36.2	13.0	12.0	1.7	4.5	3.4	2.2	3.2	9.9	22.5	60.0	18.2	28.0	18.4	
<i>punctatus</i>		Southern France																		
<i>P.</i>	ZFMK 45101	Southern France	MV	D	M	36.8	13.0	13.1	1.8	4.8	3.9	2.5	3.0	10.1	23.4	60.0	19.4	29.0	18.4	
<i>punctatus</i>		Southern France																		
<i>P.</i>	ZFMK 45085	Southern France	MV	D	M	41.0	13.4	14.0	2.5	4.5	3.4	2.4	3.0	10.7	23.0	64.0	20.5	31.0	18.8	
<i>punctatus</i>		Southern France																		
<i>P.</i>	ZFMK 45099	Southern France	MV	D	M	34.5	12.3	12.5	2.0	3.2	3.0	2.4	3.0	9.0	21.8	54.3	17.7	26.0	15.9	

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45090	Southern France	MV	D	M	38.0	12.3	12.9	2.2	4.5	3.5	2.2	2.5	9.5	23.5	61.0	19.2	28.8	18.0
<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45092	Southern France	MV	D	M	41.6	14.0	14.4	2.5	4.3	4.0	3.0	3.4	10.5	28.4	70.1	21.6	33.3	20.4
<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45086	Southern France	MV	D	M	33.7	11.2	11.3	2.0	4.6	3.0	2.2	2.3	9.3	20.8	53.0	16.2	24.6	16.3
<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45102	Southern France	MV	D	M	38.3	13.0	13.5	2.1	4.1	3.4	2.1	3.2	10.2	25.8	65.7	20.8	31.0	19.7
<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45097	Southern France	MV	D	M	34.8	11.8	11.8	2.0	4.0	3.1	2.3	3.0	9.6	24.2	56.9	17.4	26.4	16.7
<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45100	Southern France	MV	D	M	37.2	13.3	12.4	1.7	4.3	3.3	2.5	3.6	9.4	24.0	61.0	18.5	28.4	17.5
<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45096	Southern France	MV	D	M	35.6	12.1	12.2	2.0	4.2	3.1	2.2	2.7	9.6	22.6	56.0	17.0	26.1	16.7
<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45094	Southern France	MV	D	M	32.8	10.8	11.2	2.1	3.3	3.0	2.2	3.0	9.4	22.0	51.4	16.0	24.4	14.7
<i>P. punctatus</i>	ZFMK 45089	Southern France	MV	D	M	38.0	12.7	12.6	2.0	4.2	3.4	2.6	2.8	10.8	24.0	63.3	18.9	29.0	17.7
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1978.1322	Pertuis (Vaucluse)	MV	D	M	34.1	12.6	11.6	2.3	4.1	3.2	2.2	2.7	9.6	24.4	56.0	18.1	27.4	16.4
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1978.1823	Pertuis (Vaucluse)	MV	D	M	36.2	12.9	13.0	2.3	4.2	3.4	2.4	2.7	11.2	25.8	62.2	19.7	30.3	17.9
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1971.310	Rousset, bordes de l'Arc	MV	D	M	35.7	13.1	12.2	2.2	4.4	3.5	2.6	2.8	10.2	23.9	59.6	17.1	27.6	17.0
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1971.312	Rousset, bordes de l'Arc	MV	D	M	37.2	12.2	12.9	2.1	3.9	3.5	2.9	3.1	10.3	23.7	61.1	18.5	28.3	17.9
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1971.313	Rousset, bordes de l'Arc	MV	D	M	34.2	11.8	12.6	2.0	3.8	3.5	2.2	2.5	9.9	24.0	56.6	18.3	27.0	16.7
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1980.1786	environs d'Argenton s/ Creuse	MV	D	M	32.2	11.5	11.1	2.0	4.0	3.0	2.0	2.7	8.5	19.0	53.1	16.4	25.0	15.3
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1980.1785	environs d'Argenton s/ Creuse	MV	D	M	34.2	11.6	12.0	2.1	4.1	3.7	2.5	2.6	9.4	22.4	58.9	18.9	28.1	17.2
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1988.6465	La Mailleterie	MV	D	M	33.7	10.8	11.6	2.3	3.5	3.1	1.9	2.5	9.0	20.1	54.1	17.8	26.5	16.1

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>P. punctatus</i>	MNHN 1988.6468	La Mailleterie	MV	D	M	33.1	11.8	11.6	2.6	4.0	2.9	2.1	2.4	8.9	21.6	56.6	18.0	27.0	16.4
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1988.6467	La Mailleterie	MV	D	M	34.3	10.8	11.6	2.3	4.0	2.9	2.2	2.7	9.2	19.6	57.3	17.6	27.0	17.1
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1978.6466	La Mailleterie	MV	D	M	32.9	10.8	11.3	2.4	3.5	2.8	2.2	2.9	8.5	18.2	50.7	16.0	23.6	15.3
<i>P. punctatus</i>	MNHN 1988.7113	Parc Naturel Regional de la Foret d'Arient, loc. HP6	MV	D	M	31.4	11.0	11.3	2.1	3.6	3.2	2.1	2.9	8.2	19.0	52.8	16.9	25.6	15.5
<i>P. caucasicus</i>	ZFMK 72191	Turkey	MV		M	46.8	16.8	15.9	3.2	5.0	4.3	3.0	3.5	13.7	30.4	86.2	17.7	42.3	25.2
<i>P. caucasicus</i>	ZFMK 72202	Turkey	MV		M	43.7	15.4	15.0	2.5	4.8	4.0	2.6	3.6	12.5	28.4	77.4	23.7	38.0	23.4
<i>P. caucasicus</i>	ZFMK 72189	Caucasus	MV		M	48.3	16.4	15.8	2.5	4.6	4.6	3.0	3.9	12.7	29.5	87.1	26.7	41.6	25.0
<i>P. caucasicus</i>	ZFMK 52879	Caucasus	MV		M	50.1	17.0	16.3	3.3	5.0	4.7	3.1	4.0	12.5	30.4	81.7	25.9	40.0	25.2
<i>P. caucasicus</i>	ZFMK 52877	Caucasus	MV		M	50.3	17.8	16.4	3.4	5.3	4.4	3.6	4.0	14.1	32.5	83.4	27.0	41.4	25.1
Females																			
<i>P. atlanticus</i>	MB04-113	Pedreira - Benfica	JDR	A	F	35.2	12.1	11.8	1.7	3.6	3.0	2.5	2.6	9.9	22.6	58.3	18.3	27.3	18.1
<i>P. atlanticus</i>	MB 112	Cascais	JDR	A	F	31.9	11.6	11.8	2.7	4.0	3.3	2.7	2.6	9.5	22.4	58.4	18.3	28.8	19.4
<i>P. atlanticus</i>	MB 112	Cascais	JDR	A	F	33.2	12.3	12.0	2.8	3.9	3.4	2.5	2.5	9.0	20.4	55.8	16.1	24.1	16.6
<i>P. atlanticus</i>	MB 117	Cascais	JDR	A	F	33.0	10.7	10.7	2.0	4.0	2.8	2.2	2.1	8.9	21.2	51.9	16.2	24.8	16.0
<i>P. atlanticus</i>	MB 119	Cascais	JDR	A	F	36.6	11.9	11.3	1.8	3.9	3.4	2.5	2.4	9.5	23.0	55.4	17.3	26.5	17.3
<i>P. atlanticus</i>	MB 109	Benfica, Pedreira (Cantera en Benfica)	JDR	A	F	35.1	12.3	11.6	2.2	4.3	3.1	2.3	2.4	10.0	24.7	57.7	18.0	27.8	18.5
<i>P. atlanticus</i>	MB 108	Benfica, Pedreira (Cantera en Benfica)	JDR	A	F	33.9	12.3	11.5	2.0	4.1	2.6	2.4	2.3	9.0	23.5	53.5	17.5	26.3	17.7
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C32	Vila do Bispo	JDR	A	F	40.4	12.6	12.3	2.1	3.7	3.0	2.5	2.8	9.7	23.5	58.0	18.0	27.0	18.0
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C38	Vila do Bispo	JDR	A	F	34.6	11.0	11.0	2.2	3.1	3.0	2.7	2.6	8.5	19.5	51.6	15.3	24.4	15.3
<i>P. atlanticus</i>	VDB_2012.C40	Vila do Bispo	JDR	A	F	32.8	11.9	12.0	1.7	4.5	2.9	2.4	2.7	9.2	20.2	52.9	16.1	25.4	17.0

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>atlanticus</i>																			
<i>P. ibericus</i>	EBD 595	Sierra de Algodonales. Cádiz	JDR	B	F	34.5	11.6	10.6	2.4	3.7	3.1	2.0	3.1	8.0	17.5	42.0	12.4	20.4	13.9
<i>P. ibericus</i>	EBD 29825	Nava de Cabra. Córdoba	JDR	B	F	42.2	13.3	12.9	2.6	4.4	3.4	2.5	3.5	8.7	21.0	52.3	16.1	24.5	15.6
<i>P. ibericus</i>	MNCN23663	Doñana	JDR	B	F	29.0	10.7	11.2	1.6	3.6	2.4	2.4	2.5	7.2	18.0	38.7	12.8	20.2	14.2
<i>P. ibericus</i>	MNCN24258	Cádiz	JDR	B	F	34.7	11.0	10.8	2.0	2.6	3.3	1.7	2.2	8.3	19.9	47.6	15.4	23.6	15.9
<i>P. ibericus</i>	MNCN391	Alcalá de Guadaira	JDR	B	F	29.9	10.1	10.3	1.8	3.5	2.5	2.4	2.7	7.0	17.8	43.2	13.7	20.6	13.9
<i>P. ibericus</i>	ZCMV 14097	near Alcalá de los Gazules	JDR	B	F	39.2	12.6	12.8	2.6	4.4	3.2	2.9	3.4	9.6	23.0	58.1	17.6	27.7	18.4
<i>P. ibericus</i>	CM 52449	Rota-Chipiona	MV	B	F	32.5	10.2	10.5	1.9	3.1	3.0	2.2	2.5	7.5	16.9	43.7	13.7	21.1	13.1
<i>P. ibericus</i>	CM 52521-C	Trebujena-Jerez	MV	B	F	29.7	9.6	9.5	1.6	3.0	2.8	1.7	2.7	6.8	15.0	38.5	12.2	19.0	12.4
<i>P. ibericus</i>	CM 52563-B	Rota-Chipiona	MV	B	F	31.2	10.3	10.0	1.9	2.9	3.0	1.8	2.6	6.9	15.4	42.1	13.4	20.3	12.4
<i>P. ibericus</i>	CM 52563-C	Rota-Chipiona	MV	B	F	30.9	9.9	9.9	2.0	3.1	2.5	1.9	2.4	6.7	16.2	41.8	13.5	20.2	12.5
<i>P. ibericus</i>	CM 52563-D	Rota-Chipiona	MV	B	F	32.5	10.2	10.6	2.4	3.3	3.0	1.9	2.5	7.5	16.6	43.6	14.2	21.4	13.5
<i>P. ibericus</i>	CM 54288-D	19 km from Puerto Real	MV	B	F	33.4	10.9	10.8	2.1	3.1	3.1	2.5	2.8	7.5	17.2	45.1	14.3	22.6	14.0
<i>P. hespericus</i>	JDR 2012-3	Artunido a Casas de Carrasco. Sierra de Segura	JDR	C	F	38.2	12.9	12.7	2.0	4.1	3.4	2.5	3.0	11.1	23.0	60.0	19.1	29.0	18.3
<i>P. hespericus</i>	MNCN667	Valencia	JDR	C	F	40.4	13.6	12.6	1.7	3.9	3.7	2.3	2.7	10.3	25.4	59.6	19.0	29.3	19.0
<i>P. hespericus</i>	MNCN669	Valencia	JDR	C	F	42.2	12.5	12.4	2.0	3.7	3.2	2.7	3.1	11.2	28.9	62.9	18.2	29.9	19.6
<i>P. hespericus</i>	MNCN686	Valencia	JDR	C	F	38.2	12.8	12.4	2.0	4.1	3.4	2.8	2.9	10.3	24.1	60.0	18.4	28.6	18.8
<i>P. hespericus</i>	MNCN689	Ciempozuelos	JDR	C	F	39.3	12.9	13.1	2.0	3.2	3.2	2.1	2.8	11.0	25.9	59.4	16.9	27.1	18.6
<i>P. hespericus</i>	MNCN25033	La Rioja	JDR	C	F	40.3	13.8	12.8	2.3	3.7	3.4	3.2	3.1	10.3	26.3	63.5	19.3	29.6	20.1
<i>P. hespericus</i>	MNCN25035	La Rioja	JDR	C	F	38.9	13.8	12.8	2.0	3.6	3.7	2.6	2.7	10.7	24.6	58.1	17.2	27.6	18.6
<i>P. hespericus</i>	MNCN25021	Zaragoza	JDR	C	F	39.9	12.8	12.2	1.9	3.7	2.6	2.6	3.0	10.5	22.4	55.6	17.7	27.4	18.5

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN25037	Zaragoza	JDR	C	F	41.2	13.5	13.1	2.0	4.1	3.6	2.4	2.7	10.4	24.8	59.7	19.0	28.7	19.3	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN24489	Merindad de Rio Ubierna, Burgos	JDR	C	F	43.3	15.2	13.5	2.1	4.4	4.1	2.9	3.7	12.3	29.8	69.5	21.9	35.0	23.2	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN25027	La Rioja	JDR	C	F	36.7	12.4	12.1	2.0	3.5	3.6	2.1	2.7	9.3	22.7	55.6	16.8	25.7	18.0	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	MNCN25036	La Rioja	JDR	C	F	38.5	12.5	12.4	2.0	3.6	3.6	2.5	2.6	10.1	25.9	59.0	17.9	28.2	18.9	
<i>hespericus</i>																				
<i>P.</i>	ZFMK 45103	Southern France	MV	D	F	34.5	12.2	12.0	2.0	3.5	3.0	2.3	3.0	9.0	21.2	52.8	15.7	24.6	15.8	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	ZFMK 45084	Southern France	MV	D	F	34.5	11.4	11.8	1.9	4.0	3.6	2.2	2.7	9.2	21.6	57.3	17.5	27.0	17.7	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	ZFMK 45098	Southern France	MV	D	F	42.1	13.1	13.5	2.0	4.5	3.7	2.8	2.7	11.0	26.0	66.5	19.5	30.6	18.8	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	ZFMK 45087	Southern France	MV	D	F	37.3	12.6	12.2	1.9	4.0	3.0	2.0	2.4	10.0	22.6	57.3	17.1	25.4	17.1	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	MNHN 4542	probably near Paris	MV	D	F	40.8	12.3	12.5	2.5	4.0	3.3	2.3	3.2	10.1	24.2	63.4	19.5	30.0	18.9	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	MNHN 1997.1309	Le Cellier	MV	D	F	51.0	15.2	15.3	2.0	4.0	4.4	2.6	3.4	12.0	27.8	72.2	20.7	32.9	21.1	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	MNHN 2000.4255	Courmonteral (Herault)	MV	D	F	40.0	13.2	13.6	2.1	4.4	3.4	2.4	3.1	10.4	22.8	58.5	18.7	29.0	18.8	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	MNHN 1978.1324	Contes	MV	D	F	39.1	12.7	11.4	2.1	4.0	3.5	1.7	2.5	9.4	21.6	58.0	17.8	27.6	17.3	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	MNHN 1978.1325	Contes	MV	D	F	35.9	12.3	12.3	2.1	4.3	3.5	2.1	2.3	9.6	23.0	60.7	18.1	27.8	17.6	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	MNHN 1980.1787	environs d'Argenton s/ Creuse	MV	D	F	33.2	10.7	10.8	2.9	3.9	3.1	2.2	2.9	8.2	19.2	53.5	16.6	25.0	15.6	
<i>punctatus</i>																				
<i>P.</i>	ZFMK 72192	Turkey	MV		F	45.6	15.3	15.1	2.7	5.1	4.0	2.4	3.4	12.0	26.6	72.8	23.1	36.0	22.2	
<i>caucasicus</i>																				
<i>P.</i>	ZFMK 72489	Turkey	MV		F	46.0	15.5	15.6	2.6	4.9	3.3	2.6	3.4	11.9	28.2	75.6	23.6	36.6	22.2	
<i>caucasicus</i>																				
<i>P.</i>	ZFMK 72190	Turkey	MV		F	44.0	13.9	14.3	2.8	4.7	3.6	2.4	2.9	11.7	25.5	72.9	22.6	35.5	21.6	
<i>caucasicus</i>																				

Supplementary Table S3. Raw data derived from bioacoustic analysis. Each line corresponds to a different recording for each individual. The number of calls conforming to different kinds of note series are shown, i.e., a single note of type **A**, a series **AB**, and a series of one **A** note followed by 2 up to 9 **B** notes

Locality	Date	T water (°C)	Recording time (min-sec)	A	AB	AB(2)	AB(3)	AB(4)	AB(5)	AB(6-9)
<i>P. atlanticus</i>										
Vila do Bispo	04.11.2012	16.4	40"	2	10	0	0	0	0	0
Vila do Bispo	04.11.2012	16.8	1'01"	2	6	2	0	1	0	0
Vila do Bispo	04.11.2012	16.8	1'32"	1	1	3	3	1	2	1
Vila do Bispo	04.11.2012	16.8	55"	0	7	5	0	0	0	0
Vila do Bispo	04.11.2012	16.0	2'22"	7	20	10	3	3	0	0
Vila do Bispo	04.11.2012	16.0	1'15"	2	7	3	2	2	0	0
Vila do Bispo	04.11.2012	16.0	1'15"	5	13	7	1	1	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	16.3	1'56"	2	24	2	2	0	0	0
Vila do Bispo	04.11.2012	16.3	1'00"	1	14	0	1	0	0	0
Vila do Bispo	04.11.2012	16.3	56"	1	10	2	1	0	0	0
Vila do Bispo	04.11.2012	16.6	1'56"	2	3	4	0	3	3	2
Vila do Bispo	04.11.2012	16.6	48"	1	5	0	1	1	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	16.8	1'07"	3	7	2	1	1	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	21.0	24"	1	2	3	0	1	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.0	50"	0	9	9	0	0	1	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.0	54"	0	4	12	0	3	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.0	50"	2	1	5	3	2	1	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.0	1'00"	2	13	4	3	0	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.1	1'00"	1	2	0	10	5	2	2
Vila do Bispo	03.11.2012	20.8	1'10"	5	7	4	4	0	0	1
Vila do Bispo	03.11.2012	20.2	16"	0	3	0	2	0	0	1
Vila do Bispo	03.11.2012	20.2	1'00"	3	3	6	3	0	1	1
Vila do Bispo	03.11.2012	20.5	45"	0	5	5	3	2	1	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.5	45"	4	5	4	0	0	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.5	1'10"	1	8	10	4	0	0	0

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Vila do Bispo	03.11.2012	20.3	17"	0	2	2	0	0	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.6	17"	0	1	0	1	2	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.3	48"	2	7	6	0	0	0	0
Vila do Bispo	03.11.2012	20.6	48"	1	1	3	4	2	2	0
Vasco da Gama	NA	10.0	1'30"	0	7	11	2	0	0	0
São Salvador	NA	Air: 10.4		1	7	16	0	1	0	0
Coimbra	NA	Air: 10.0		0	10	2	0	0	0	0
Mindelo	29.01.2015	13	1'43"	1	4	7	1	0	0	0
Mindelo	29.01.2015	13	1'41"	0	4	3	1	0	0	1
Mindelo	29.01.2015	13	56"	0	2	0	3	0	0	0
Mindelo	29.01.2015	13	56"	1	2	0	3	0	0	0
Mindelo	29.01.2015	13	1'43"	1	4	1	4	1	1	0
Mindelo	29.01.2015	12	44"	0	0	3	1	0	0	0
Mindelo	29.01.2015	12	1'24"	0	3	3	3	0	0	0
<i>P. ibericus</i>										
Lora del Río	08.11.2012	16.0	1'46"	0	0	4	0	0	0	0
Lora del Río	08.11.2012	17.0	2'06"	0	2	2	2	0	0	0
Lora del Río	08.11.2012	17.0	1'03"	0	1	2	1	0	0	0
Lora del Río	08.11.2012	16.4	1'37"	0	3	5	0	0	0	0
Monte de Trigo - Atalaya	08.02.2003	10.3	1'32"	0	1	9	10	0	0	0
Montesjuntos	29.03.2003	17.4	1'53"	0	1	23	3	0	0	0
Montellano	16.11.2014	18.1	2'00"	3	19	4	1	0	0	0
Montellano	16.11.2014	18.1	2'00"	3	6	6	1	0	0	0
Montellano	16.11.2014	18.0	1'00"	0	1	6	3	0	0	0
Montellano	16.11.2014	18.1	1'00"	3	0	6	4	3	1	0
Montellano	16.11.2014	18.3	1'08"	0	0	1	8	2	1	0
Montellano	16.11.2014	19.4	1'28"	2	2	3	1	3	0	0

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (*Pelodytes* spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

Montellano	16.11.2014	19.4	1'28"	0	8	5	1	0	0	0
Montellano	16.11.2014	19.0	1'18"	2	2	4	1	0	0	0
Montellano	16.11.2014	19.0	1'18"	2	1	3	1	1	1	0
Montellano	16.11.2014	19.1	2'02"	0	2	4	7	1	0	0
Montellano	16.11.2014	19.1	2'02"	2	3	5	2	0	1	0
Montellano	16.11.2014	19.4	1'13"	0	0	0	16	0	0	0
Montellano	16.11.2014	19.1	1'13"	0	3	4	0	0	0	0
Montellano	16.11.2014	19.0	1'13"	0	2	2	3	2	0	0
Montellano	16.11.2014	19.4	1'11"	0	0	5	3	0	0	0
Montellano	16.11.2014	19.4	1'11"	0	0	1	3	0	0	0
Mértola	26.11.1997		0'56"	0	0	1	5	3	5	1
Mértola	26.11.1997		0'56"	0	0	1	0	2	0	0
Mértola	26.11.1997		2'08"	0	0	7	14	1	1	0
Mértola	27.11.1997	14.4	1'35"	0	0	2	1	2	0	0
Mértola	27.11.1997	15.2	3'26"	0	0	21	15	0	1	0
Castro Verde	NA	12.6	2'29"	0	0	1	1	5	0	0
Mértola	NA	15	2'48"	0	0	12	7	6	0	0
Mértola	NA	15		0	11	10	1	1	0	0
Mértola	01.01.2007	16		0	9	10	0	1	0	0
Mértola	01.01.2007	16		0	0	12	7	6	0	0
<i>P. hespericus</i>										
Ctra. Puerto Lumbreras	01.03.1991	11.0	1'17"	0	11	0	0	0	0	0
Ctra. Puerto Lumbreras	01.03.1991	9.4	1'30"	0	9	0	0	0	0	0
Ctra. Puerto Lumbreras	01.03.1991	9.4	0'27"	0	6	0	0	0	0	0
Ctra. Puerto Lumbreras	01.03.1991	9.8	0'25"	0	5	0	0	0	0	0
Ctra. Puerto Lumbreras	01.03.1991	9.8	0'25"	0	5	0	0	0	0	0
Artunido – Casas de Carrasco	09.04.2014	NA	2'42"	1	35	0	0	0	0	0
Artunido – Casas de Carrasco	09.04.2014	NA	2'42"	1	24	0	0	0	0	0
Artunido – Casas de Carrasco	09.04.2014	NA	0'29"	0	7	0	0	0	0	0
Artunido – Casas de Carrasco	09.04.2014	NA	0'29"	0	4	1	0	0	0	0

INTEGRACIÓN DE DATOS MOLECULARES, BIOACÚSTICOS Y MORFOLÓGICOS REVELAN DOS NUEVAS ESPECIES DE PELODYTES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Artunido – Casas de Carrasco	09.04.2014	NA	0'24"	0	2	0	0	0	0	0
Artunido – Casas de Carrasco	09.04.2014	NA	0'24"	1	6	0	0	0	0	0
Artunido – Casas de Carrasco	09.04.2014	NA	1'02"	1	5	0	0	0	0	0
Artunido – Casas de Carrasco	09.04.2014	NA	1'02"	3	5	0	0	0	0	0
Masa	NA	NA		0	18	0	0	0	0	0
Valencia	NA	NA		0	28	0	0	0	0	0
Vélez Rubio	01.01.1998	NA	53"	0	11	0	0	0	0	0
<i>P. punctatus</i>										
NA	NA	NA	0'30"	0	1	4	0	0	0	0
NA	NA	NA	0'30"	0	1	3	2	0	0	0
NA	NA	NA	0'51"	0	9	0	0	0	0	0
NA	NA	NA	0'39"	0	1	3	2	0	0	0
NA	NA	NA	0'39"	0	0	4	2	1	0	0
NA	NA	NA	1'51"	0	18	6	6	0	0	0
NA	NA	NA		0	15	2	3	0	0	0
Can Catà, Parc Natural de Collserola	03.02.2009	NA	2'07"	1	11	1	0	0	0	0
Can Catà, Parc Natural de Collserola	03.02.2009	NA	1'31"	3	2	2	1	0	1	0
Can Catà, Parc Natural de Collserola	03.02.2009	NA	2'00"	1	9	6	2	0	0	0
Can Catà, Parc Natural de Collserola	03.02.2009	NA	2'20"	1	2	6	3	0	1	0
Can Catà, Parc Natural de Collserola	03.02.2009	NA	1'51"	0	2	5	1	2	0	1
Can Catà, Parc Natural de Collserola	03.02.2009	NA	2'44"	0	4	4	2	1	0	0

CAPÍTULO 3: Análisis genético de dos zonas de contacto secundario entre *P. atlanticus*, *P. ibericus* y *P. hespericus* en el sur de la Península Ibérica

Genetic analysis of two secondary contact zones between *P. atlanticus*, *P. ibericus* and *P. hespericus* in Southern Iberian Peninsula

Abstract

The studies about the parsley frog, presented in our previous publications, support the genetic structure of the populations, the geographical diversification of the genus all over Western distribution range and the level of taxonomic complexity, higher than the one proposed nowadays. As in others Iberian taxa, the distribution of the molecular variation in the genus *Pelodytes* reflects a phylogeographical pattern, as a result of genetic divergences occurring in allopatric shelters during glacial periods. This old fragmentation process, probably occurring repeatedly throughout the Pliocene and Pleistocene, would be the origin of the separation among the different lineages in the Iberian Peninsula. Additionally, this process suggests independent evolutionary paths for a cryptic complex of four species: *Pelodytes atlanticus*, which is endemic in Portugal and distributed along the coast and the central region (Alto Alentejo); *Pelodytes ibericus*, which is endemic to the south of the peninsula (Algarve, Baixo Alentejo, Andalusia, Extremadura); *Pelodytes hespéridus*, distributed in the Spanish center and eastern area (Castilla-La Mancha, Madrid, Murcia, Comunidad Valenciana, Castilla y León, Navarra, La Rioja, Aragon); and *Pelodytes punctatus*, whose populations are distributed from the northeastern Spain to the rest of Europe (Catalonia, France and Italy). As results of this study, we found the existence of hybridization and cytonuclear discordance in presumed areas of secondary contact, suggesting a certain degree of admixture. In order to explore these patterns of admixture and evaluate the previous results, we analysed the levels of structure and gene flow of the populations through two very well differentiated areas of secondary contact between the mitochondrial clades of *P. ibericus* and the two new species proposed: *P. atlanticus* and *P. hespericus*. By using mtDNA and microsatellite data, a genetic analysis of both areas allowed us to clarify the mix level between the divergent lineages and to determine whether those lineages evolve independently. We tried to assess the population genetic structure within each lineage, with nuclear data and the estimates of inferred genetic diversity of the mitochondrial DNA. The overall coincidence of both analysis and the generality of clines, observed in relation to the dispersion, support the idea that both contact areas are acting as a barrier to gene flow showing, however, a clearly uneven pattern among the species. The inferred results prove a geographic pattern of introgression in the Portuguese contact zone, between the species *P. ibericus* and *P. atlanticus*. In contrast, the contact zone between *P. ibericus* and *P. hespericus* in Spain, compared with the previous one, showed a relatively low number of localities in

which some mixture was detected among the parental genotypes. The results at the level of mitochondrial DNA helped us to identify the lineages of each species, confirming the presence of different haplogroups with distinctive patterns of gene flow. The presence of individuals from different mitochondrial lineages in the absence of nuclear differentiation, especially in the western area of contact, and the pattern of introgression in the distribution range of *P. atlanticus* suggest, however, that: 1. there exists dispersion; 2. the effective reproductive isolation between the lineages has not been completed; 3. there are barriers to gene flow, mainly promoted by intrinsic factors that could be due to the barriers of both pre-zygotic and post-zygotic types. However, the relatively long evolutionary time elapsed between both species separately, can also be the source of this segregation. By contrast, in the contact zone between *P. ibericus* and *P. hespericus*, no similarity was detected in the allele frequencies between lineages, despite the low levels of introgression, suggesting that this is a significant barrier to gene flow mainly due to factors associated with the ecological habitat.

Keywords: *gene flow, hybrid zones, cryptic species, introgression, dispersion, clines, speciation*

Análisis genético de dos zonas de contacto secundario entre *P. atlanticus*, *P. ibericus* y *P. hespericus* en el sur de la Península Ibérica

Resumen

Los estudios en el sapillo moteado, presentados en nuestras publicaciones precedentes, apoyan la estructura genética de las poblaciones, la diversificación geográfica del género dentro del rango de distribución en la Península Ibérica y un nivel de complejidad taxonómica mayor que el propuesto en la actualidad. Como en otros taxones ibéricos, la distribución de la variación molecular en el género *Pelodytes* responde a un patrón filogeográfico, resultado de una divergencia genética ocurrida en refugios alopatricos durante largos periodos glaciares. Este proceso de fragmentación antiguo, sufrido probablemente en repetidas ocasiones a lo largo del Plioceno y Pleistoceno, sería el origen de la separación entre los distintos linajes en la península y sugiere, además, trayectorias evolutivas independientes para un complejo críptico de cuatro especies: *Pelodytes atlanticus*, endémico de Portugal y distribuido a lo largo de la costa y la región central (Alto Alentejo); *Pelodytes ibericus*, endemismo del sur de la península (Algarve, Baixo Alentejo, Andalucía, Extremadura); *Pelodytes hespericus*, distribuido por el área de centro y levante español (Castilla-La Mancha, Madrid, Murcia, Comunidad Valenciana, Castilla y León, Navarra, La Rioja y Aragón) y *Pelodytes punctatus* cuyas poblaciones se distribuyen desde el noreste peninsular al resto de Europa (Cataluña, Francia e Italia). Como resultados de este estudio, se encontró la existencia de hibridación y discordancia cito-nuclear en supuestas zonas de contacto secundario, que sugieren cierto grado de mezcla. Con el objetivo de

explorar estos patrones de mezcla y valorar los resultados anteriores, se analizaron los niveles de flujo y estructura génica de las poblaciones en dos áreas de contacto secundario bien diferenciadas, entre los clados mitocondriales de *P. ibericus* con las dos nuevas especies propuestas en esta tesis: *P. atlanticus* y *P. hespericus*. Mediante el uso de ADNmt y datos de microsatélites, un análisis genético de ambas zonas permitió aclarar el nivel de mezcla entre los linajes divergentes y determinar si evolucionan de forma independiente. Se trató de evaluar, por una parte, la estructura genética poblacional dentro de cada linaje con datos nucleares y las estimaciones de la diversidad genética inferidas del ADN mitocondrial. La coincidencia global de ambos análisis y la generalidad de las clinas observadas en relación a la dispersión, apoyan la idea de que ambas zonas de contacto están actuando como una barrera para el flujo de genes, observándose, sin embargo, un patrón claramente desigual entre unas especies y otras. Los resultados mostraron un patrón geográfico de introgresión en la zona de contacto portuguesa, entre las especies *P. ibericus* y *P. atlanticus*. Por el contrario, la zona de contacto entre *P. ibericus* y *P. hespericus* en España, en comparación con la anterior, mostró un número relativamente bajo de localidades en las que fue detectada mezcla entre los genotipos parentales. Los resultados a nivel de ADN mitocondrial, permitieron identificar los linajes de cada especie, corroborando la presencia de distintos haplogrupos con patrones distintivos de flujo génico. La presencia de individuos pertenecientes a distintos linajes mitocondriales en ausencia de diferenciación nuclear, especialmente en la zona de contacto occidental, y el patrón de introgresión en el rango de distribución de *P. atlanticus* sugieren, no obstante que: 1. existe dispersión; 2. el aislamiento reproductivo efectivo entre los linajes no se ha completado; 3. existen barreras al flujo génico de origen genético, promovidas por factores intrínsecos que podrían ser debidas tanto a barreras de tipo pre-cigótico como post-cigótico. No obstante, el relativo largo tiempo evolutivo transcurrido por separado entre ambas especies puede también estar en el origen de dicha segregación. Por el contrario, en la zona de contacto entre *P. ibericus* y *P. hespericus*, no se detectó similitud alguna en las frecuencias alélicas entre los linajes, a pesar de los bajos niveles de introgresión, lo que hace pensar que se trata de una barrera importante al flujo génico debida principalmente a factores asociados con el hábitat ecológico.

Palabras clave: *flujo de genes, zonas híbridas, especies crípticas, introgresión, dispersión, clinas, especiación*

1. Introducción

El estudio de los patrones de diversificación y flujo génico es fundamental para el conocimiento de las especies. La capacidad de que dos especies distintas permanezcan en simpatría es el único test objetivo de especiación (Jiggins & Mallet, 2000) pero encontrar esta situación en la naturaleza no siempre es sencillo. El interés evolutivo de las zonas híbridas se centra en que constituyen un auténtico laboratorio natural para el estudio de fenómenos y procesos relacionados con la especiación (ver por ejemplo Hewitt, 1988). Una zona híbrida es un área geográfica donde interactúan distintos linajes de individuos genéticamente diferenciados y que puede prolongarse en el tiempo mientras ocurra un cambio fenotípico y/o genotípico a través de ellas, produciéndose mezcla al menos en alguna parte de la descendencia (Barton & Hewitt 1985; Harrison 1990; Arnold 1997; Jiggins & Mallet, 2000). Las zonas de contacto secundario entre linajes diferenciados en refugios alopátricos son un claro ejemplo de zonas híbridas.

Como veíamos en la introducción de esta tesis, de un número cada vez más amplio de estudios se extrae que las penínsulas del Mediterráneo (Ibérica, Itálica, Balcánica y Anatólica) así como áreas del Cáucaso y el mar Caspio, han funcionado como refugios glaciares en el pasado, permitiendo la supervivencia de numerosas especies durante condiciones climáticas adversas (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt, 2000, 2004) y actuando a la vez, como reservorio u origen de endemismos, y como fuentes, desde las cuales, zonas anteriormente heladas fueron recolonizadas durante periodos interglaciares (Hewitt, 2001; Weiss & Ferrand 2007). Los periodos temporales cíclicos, con los procesos de contracción asociados hacia refugios del sur y expansión posterior hacia el norte, han dejado profundas huellas en la distribución geográfica de la diversidad genética (Taberlet *et al.* 1998; Hampe & Petit 2005). De acuerdo con el concepto de “refugios dentro de refugios” (Gómez & Lunt 2007), la Península Ibérica constituyó uno de los refugios glaciares más importantes en el sur de Europa (Hewitt 2000) donde las rutas de recolonización seguidas por diversos grupos taxonómicos encontraron paralelismo entre sí (Hewitt, 1996, 2004). Por una parte, el gradiente de variación genética junto al evidente nivel de diversidad y subestructura que se observa a bajas latitudes en una amplia variedad de taxones – patrón denominado “pureza del norte y riqueza del sur”– constituye una prueba de la existencia de múltiples subrefugios glaciares. A diferencia de las poblaciones nórdicas, típicamente menos diversas a consecuencia de la rápida expansión, la persistencia de poblaciones confinadas en diferentes refugios permitió la diferenciación en una amplia gama de linajes evolutivos. Por otra parte, este proceso de recolonización llevó a la creación de zonas híbridas, donde genomas de linajes divergentes entraron en contacto secundario (Hewitt, 1999; Taberlet *et al.*, 1998). A diferencia de las zonas de contacto producidas por la recolonización de áreas del norte de Europa, la dinámica de flujo génico, los patrones de introgresión y estructura en el interior de zonas híbridas a latitudes bajas, donde se deduce una persistencia de las poblaciones a largo plazo, ofrecen un modelo de estudio más

complejo e interesante, especialmente para especies cuyos rangos de distribución abarcan regiones sujetas a fluctuaciones paleoclimáticas de gran amplitud (Weiss & Ferrand, 2007).

Un ejemplo de especies con este tipo de distribución es el de los sapillos moteados (*Pelodytes spp.*), actualmente restringidos a Europa occidental que, en base al registro fósil, estuvieron ampliamente distribuidos en Europa en el pasado, con presencia documentada desde el Eoceno (Roček & Rage, 2000; Sanchíz, 1998a). En la actualidad, la familia Pelodytidae se encuentra representado únicamente por el género *Pelodytes*, con tres especies vivientes: *Pelodytes caucasicus* (Boulenger, 1896), que se extiende de manera fragmentada por la región del Cáucaso y la costa este del Mar Negro; *Pelodytes ibericus* (Sánchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom & Sanchíz, 2000) especie endémica del sur de la península; y *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1803) que según el estatus actual de la especie, se encuentra presente en gran parte de Europa Occidental. Sin embargo, los estudios filogeográficos previos, centrados en la Península Ibérica y detallados en los capítulos anteriores de esta tesis, sugieren que la diversidad en el interior del grupo se encuentra subestimada. El patrón de variación genética de las secuencias nucleares y mitocondriales, obtenidas a partir de localidades de todo el rango de distribución, concluye la existencia de, al menos, cuatro linajes evolutivos independientes en Europa Occidental (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015). Los estudios filogenéticos de divergencia entre los clados apuntan a un origen Plio-Pleistocénico con edades para cada filogrupo estimadas en un rango entre 2,3 a 3,8 millones de años. La fuerte correlación entre la variación genética encontrada y la geografía, sugieren una historia evolutiva en refugios alopatricos, con la presencia, inicialmente propuesta, de dos especies candidatas, y descritas posteriormente como *P. atlanticus* y *P. hespericus*.

Del resultado de este estudio se extrae un patrón, concordante con otros grupos taxonómicos, de expansión post-glacial hacia el norte, especialmente evidente en el interior de los linajes de *P. ibericus*, *P. hespericus* y *P. punctatus*, así como la detección de discordancia cito-nuclear y presencia de individuos con alelos nucleares y mitocondriales en estrechas zonas de simpatria, que permitieron la identificación de zonas de contacto secundario. En el presente capítulo se pretenden explorar los patrones de introgresión y flujo génico en el interior de dos zonas híbridas entre *P. ibericus* y las dos nuevas especies propuestas en la presente tesis: a) *P. atlanticus*, en el suroeste de Portugal; y b) *P. hespericus*, en el sureste de España. A través del uso de ADN mitocondrial– mediante análisis de secuencias de los genes mitocondriales mt-ND4, mt-CYB, del polimorfismo de fragmentos de restricción o RFLP– y de la variación nuclear en marcadores de evolución rápida– análisis de polimorfismo en 14 microsatélites desarrollados con éxito para *P. ibericus* y *P. punctatus* (van de Vliet *et al.* 2012; Jourdan-Pineau *et al.* 2012) se estudiaron ambas zonas de contacto de manera independiente, con el objetivo principal de evaluar su estructura geográfica y los posibles patrones de flujo génico, tratando específicamente de determinar los factores que influyen la estructura genética

de estas zonas, sean intrínsecos, debidos principalmente a barreras de aislamiento reproductivo pre y post-cigóticas, o extrínsecos, asociados a la adaptación ecológica diferencial al hábitat local. La existencia de dos áreas separadas de características ecológicas en apariencia muy diferentes, mostró entre *P.atlanticus*/*P. ibericus* un ambiente ecológico homogéneo sin solución de continuidad y sin barrera ecológica apreciable y otra entre *P. ibericus*/*P.hespericus* con una barrera orográfica que podría determinar parcialmente aislamiento entre las especies parentales. El presente estudio, nos permite el análisis a escala detallada de zonas híbridas surgidas del contacto secundario entre unidades evolutivas diferenciadas en refugios glaciares independientes del sur de Europa. Además adquiere un matiz especial dado el escaso conocimiento actual de los dos nuevos taxones (biología reproductiva, dispersión, etc.) que, en base a nuestra hipótesis, pertenecen a un complejo críptico de especies.

2. Material y métodos

2.1. Diseño de muestreo y trabajo de laboratorio

Para el presente capítulo, en base a los resultados del análisis filogeográfico del género *Pelodytes* realizado previamente y presentado en los capítulos anteriores de esta tesis, se planificó el muestreo en áreas pertenecientes a las dos supuestas zonas de contacto secundario entre las dos especies, consideradas hasta ese momento, presentes en la Península Ibérica (*P. ibericus* y ambos linajes de *P. punctatus*) y que, solamente *a posteriori*, han podido ser descritas como dos nuevas especies. Se realizó un muestreo intenso durante la época de reproducción entre los años 2009 y 2012 en localidades dentro del hábitat reproductivo de las especies –charcas y arroyos temporales– en concreto: a) en la zona de contacto portuguesa en localidades claramente atribuidas a *P. ibericus* y *P. atlanticus*, desde el área de distribución de Andalucía occidental (provincias de Sevilla, Huelva y Cádiz) y sur de Portugal, hasta la costa portuguesa, incluyendo los distritos de Faro, Beja y Setúbal (Algarve y Alentejo); y b) entre *P. ibericus* y *P. hespericus*, desde el interior del límite de distribución de *P. ibericus* al este de Andalucía (en la provincia de Jaén) hasta Almería y por el noreste hasta las provincias de Castilla-La Mancha (Albacete y Ciudad Real). Además, se obtuvieron muestras procedentes de individuos conservados en alcohol en el Museo de Lisboa (MUHNAC: Museu Nacional de História Natural e da Ciência) capturadas por el Prof. Eduardo G. Crespo (FCUL), principalmente de poblaciones de *P. atlanticus* presentes en el interior del rango de distribución de la especie y alejadas de la zona de contacto.

Con el fin de detectar el mayor número de localidades reproductivas, se intensificó el esfuerzo de muestreo en las supuestas zonas de contacto secundario entre las especies dentro de un rango de 200 km. Inicialmente para el presente estudio se tomaron de 10 a 25 muestras por localidad en el interior de la área de contacto y de 2 a 10 muestras por localidad en poblaciones alejadas de la zona de contacto, hasta un total de 850 muestras procedentes de 114 localidades. Posteriormente, se realizó un

“buffer” en ArcGis v10.3 para calcular exactamente la distancia entre cada una de las localidades. Teniendo en cuenta los patrones de dispersión de otras especies de anuros y el escaso número de sitios reproductivos encontrados, muchos de los cuales desaparecieron en el transcurso de nuestro estudio, (especialmente en Portugal) se consideró la misma localidad a las poblaciones situadas en un radio inferior a 5 km sin ningún tipo de barrera geográfica intermedia, accidente geográfico, río o población humana. Las localidades se etiquetaron con las tres primeras letras del municipio o población más cercana. En segundo lugar, se seleccionaron localidades distanciadas 10-25 km entre sí, a lo largo de la línea imaginaria de un transecto en ambas zonas de contacto, tratando de seguir la dirección noreste desde el suroeste de Portugal (Sagres) – Algarve, Baixo Alentejo, Extremadura – y en dirección noreste en España (Andalucía oriental)– incluyendo el suroeste de la comunidad autónoma de Castilla-La Mancha– Ver figura 1.

El tejido utilizado para los análisis se obtuvo a partir de las colas de las larvas (corte del extremo distal de la cola < 1 cm) de individuos vivos y tejido muscular del interior de la extremidad posterior de individuos conservados en el Museo de Lisboa. Para evitar muestrear dos veces la misma larva en una localidad, todos los ejemplares fueron tomados al mismo tiempo y sólo se tomó tejido de colas intactas. Las larvas fueron puestas en libertad inmediatamente después de la extracción en el mismo lugar donde fueron capturadas. Los tejidos fueron conservados en Etanol al 70% y conservados a temperatura ambiente. La captura fue realizada con los permisos correspondientes mediante vadeadoras y mangas que se usaron desinfectadas con Virkon, junto con las botas, siguiendo un protocolo de limpieza entre una y otra localidad.

La cantidad total de ADN fue extraída de estos tejidos siguiendo tres protocolos diferentes de extracción, dependiendo de la cantidad y la calidad del ADN disponible: para la mayoría de los tejidos obtenidos de individuos vivos, se usó el protocolo de lisis alcalina HotShot de Truett (2000) o el protocolo de extracción salina de Sambrook *et al.* (1989) y para los casos más complicados, a partir del tejido de ejemplares conservados en el museo de Lisboa, se usó el Kit de extracción Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención de los fragmentos RFLP a partir del ADN mitocondrial, se utilizaron los mapas de restricción del fragmento de 705 pb perteneciente al fragmento del gen Citocromo b (mt-CYB) que fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para todos los individuos de ambas zonas de contacto utilizando los siguientes cebadores y condiciones: L14724 (Irwin *et al.* 1991), y MVZ16 (Moritz *et al.* 1992), con una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 180 s y 35 ciclos, compuestos por una fase de desnaturalización de 92°C, durante 40 s; hibridación de 47°C, durante 60 s; y elongación de 72°C, durante 90 s; seguidos por una extensión final de 300 s a 72°C. Una parte del producto de amplificación (2 µl) fue cargado y migrado en un gel de agarosa al 1% para testar el resultado de la reacción. El resto, fue incubado con las enzimas de restricción FOK-I y HPH-I

siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la reacción fue migrado en gel de agarosa al 2% para separar bien los distintos tamaños de corte y permitir identificar claramente la pertenencia a uno u otro linaje mitocondrial.

De un total de 23 microsatélites testados y específicos para *Pelodytes punctatus* publicados previamente por van de Vliet *et al.* (2008) y Jourdan-Pineau *et al.* (2009) y disponibles en GeneBank (Accession numbers EU626988-EU626995; EU667612-EU667626), tan solo 14 amplificaron para todas las poblaciones de *Pelodytes* del sur de la Península Ibérica. Para obtener el perfil genético de los individuos en las zonas de estudio y en localidades claramente pertenecientes a los linajes parentales, el conjunto de microsatélites se amplificó para todas las muestras (ver Tabla 1). Las PCRs fueron realizadas mediante tres Multiplex diferentes, en un volumen final de 10 μ l, incluyendo 5 μ l de Master Mix, 1 μ l de Mix de cebadores y 1,5 μ l de muestra (80 ngr). Para ello se establecieron dos protocolos de amplificación mediante curva de temperatura descendente (Touchdown) de 0,5°C cada minuto. Para los mix de marcadores multiplex 1 y 3 se usaron las siguientes condiciones con temperatura de desnaturalización inicial de 95°C durante 15 min. seguida por tres ciclos consecutivos de 15 pasos cada uno: a) 95°C por 30s, curva de touchdown desde 62 °C a 53°C por 45s, 72°C por 45s, b) 95°C por 30s, 55°C por 45s, 72°C por 45s; y c) 95°C por 30s, 53°C por 45s, 72°C por 45s con un paso final de 60°C por 30 min. Para la multiplex con el mix 2, se usó igualmente una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C durante 15 min; posteriormente se realizó un primer ciclo de 15 pasos con 95°C por 30s, curva de touchdown desde 68°C a 52°C por 45s y 72°C por 45s y un segundo ciclo de 26 pasos de 95°C por 30s, 52°C por 45s y 72°C por 45s y una temperatura final de 60°C durante 30 min. 1 μ l del resultado de estas reacciones de PCR fue diluido en 10 μ l de formamida desionizada y 0,2 μ l de tamaños de fragmento estándar (Genescan-500, LIZ, ABI, Foster City, California, USA) para el genotipado. El tamaño de los fragmentos fue determinado en un secuenciador capilar ABI Prism 3130XL. Los fragmentos fueron clasificados, identificados y revisados por manualmente usando GENEMAPPER V4.0 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

2.2. Análisis de variación mitocondrial

Además del análisis individual de discriminación de clados mitocondriales, basados en el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen mt-CYB, se realizó una genealogía de máxima verosimilitud a partir de un fragmento combinado de los genes mt-CYB y mt-ND4. Del conjunto de secuencias disponibles y previamente publicadas (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015) fueron seleccionadas aquellas pertenecientes exclusivamente a individuos de las localidades para las que se disponía de datos de microsatélites (individuos pertenecientes a las localidades incluidas en el presente estudio) y que fueron analizadas pormenorizadamente (ver más adelante). El alineamiento final, con un total de 180 secuencias compuestas por ambos fragmentos (1495 pares de bases), fue

revisado a ojo y alineado con el editor de alineamientos de secuencias BioEdit v7 (Hall 1999). Para inferir las relaciones genealógicas de las secuencias de ADN mitocondrial, se construyó una red de haplotipos mediante uniones intermedias o “*Median-joining*” (Bandelt *et al.* 1999) usando el software Network v4.612 software (Fluxus Technology, <http://www.fluxus-engineering.com/>). La asignación de los haplotipos a cada linaje de la red se implementó además con el análisis filogenético de Máxima verosimilitud (ML) en HapView v4.2 (Salzburger 2011) mediante RaxML v7.2.7 (Stamatakis, 2006) a través del Portal de Cipres Science Gateway V. 3.1 (Silvestro & Michalak 2010). Cada marcador fue analizado como una partición independiente con el modelo de sustitución elegido por jModeltest v 2.1.1, basado en el Criterio de Información Bayesiano (Darriba *et al.* 2012). La red de haplotipos resultante con las distancias genéticas entre cada linaje se encuentra en la figura 2. Posteriormente, para cada localidad incluida en los transectos (ver más adelante), se calculó también la diversidad nucleotídica (π) y se evaluó la estructura poblacional dentro de cada linaje de ADNmt por la estima del valor de Fst (Excoffier *et al.* 1992). Los valores de Fst entre pares de localidades se calcularon como una medida de la diferenciación genética frente a la estima del valor medio de las distancias p-no corregidas entre las secuencias del fragmento de ANDmt por cada linaje. Todas las pruebas se realizaron en la versión GeneAIEx 3,11 (Excoffier *et al.* 2005), DNAsp (Librado & Rozas, 2009) y Mega 6.06 (Tamura *et. al.* 2013). La información acerca de los haplotipos detectados, los parámetros de diversidad genética y estructura poblacional por localidad, se recoge en las tablas 2 y 3.

2.3. Análisis de la variación nuclear en marcadores de evolución rápida: microsatélites

Con la intención de distinguir la contribución de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg debidas a factores biológicos— como la estructura poblacional, el emparejamiento no aleatorio, el porcentaje de migrantes y la selección en contra de los híbridos— de los errores técnicos que pueden ocurrir durante el proceso de amplificación y el genotipado— como la existencia de alelos nulos y/o dropout— se determinó la posible presencia de estos últimos dentro del conjunto de datos de microsatélites mediante análisis con MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) y FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007). No se detectó presencia de dropout en ninguno de los casos. Cuando se detectó la presencia de alelos nulos en el conjunto de poblaciones, especialmente en localidades parentales (alejadas de las zonas de contacto), sus frecuencias fueron estimadas siguiendo tres metodologías independientes: (1) la primera calcula las frecuencias de alelos nulos para cada locus y la población analizada después de la expectativa de Maximización (EM) utilizando el algoritmo de Dempster, Laird y Rubin (1977); (2) una segunda, en la que se estima el FST siguiendo el método descrito por Chapuis y Estoup (2007); y por último (3) calculando la distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) siguiendo el método descrito por Chapuis y Estoup (2007). De los 14 marcadores amplificados, finalmente sólo 7 fueron seleccionados para evaluar los efectos derivados de

la propia dinámica poblacional dentro de cada área de contacto. A pesar de que estos marcadores fueron desarrollados para *Pelodytes* y no es la primera vez que ambos conjuntos de microsatélites son usados para el estudio de poblaciones pertenecientes a estas especies (van de Vliet *et al.* 2012), ninguno de los marcadores describió anteriormente desequilibrio de ligamiento (ver van de Vliet *et al.* 2012; Jourdan-Pineau *et al.* 2012). No obstante, se realizaron pruebas para evaluar posibles asociaciones no aleatorias entre los genotipos diploides para cada par de loci, a través del G-test (número de lotes=100, iteraciones por lote=5000) usando el algoritmo de cadena de Markov implementado en GENEPOP v4.0 (Rousset 2008) y GeneAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). Ninguno de los pares de marcadores, desarrollados conjuntamente en los trabajos citados, presentó valores significativos entre todas las localidades “parentales” muestreadas en el presente estudio; solamente un par, desarrollado independientemente en uno y otro estudio, presentó un valor de probabilidad significativo de acuerdo con el test de Fisher; dicho par fue posteriormente excluido y no se usó conjuntamente en ninguna de las dos áreas de contacto. Para cada locus, el nivel de polimorfismo en cada población y dentro de cada linaje mitocondrial, fue determinado cuantificando el número de alelos y la frecuencia con GENEPOP v4.0. Los tests de equilibrio Hardy–Weinberg (HWE) y medidas de diversidad genética estándar, heterocigosidad observada (H_o), esperada (H_e), frecuencias, fueron estimados para todo el conjunto de datos usando GENEPOP v4.0 y están representados en la tabla 4. Se usó el procedimiento de Bonferroni (Rice 1989) para establecer el umbral de significación estadística generada por comparaciones múltiples.

Para comprobar la posible correspondencia entre la estructura poblacional dependiente de los genes nucleares y los clados de ADNmt previamente obtenidos por RFLP para cada individuo, se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) con ARLEQUIN v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), agrupando los individuos según su linaje ADNmt en los transectos de cada zona de contacto (ver tabla 5). Se representó geográficamente la proporción de pertenencia por localidad a uno u otro linaje en base al resultado del análisis individual de RFLP para el mismo fragmento de mt-CYB en ambas zonas de contacto (Figura 4).

Con el objetivo de evaluar el porcentaje de mezcla entre cada uno de las especies, en base a los datos de microsatélites, se realizó un análisis de agregación bayesiano en STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) utilizando dos bases de datos: una, conteniendo el total de marcadores, y otra reducida, sólo con aquellos en los que la presencia de alelos nulos quedó claramente descartada. En un análisis exploratorio para inferir el número de clústeres o grupos de individuos genéticamente homogéneos (K), se realizaron tests de cinco simulaciones independientes con valores de K desde 1 hasta 7 inclusive con un periodo de calentamiento de 10.000 iteraciones (burn-in) y 500.000 iteraciones de datos. Los análisis fueron realizados usando el modelo de mezcla con frecuencias alélicas correlacionados entre las poblaciones. Según este modelo, los individuos pueden tener una

ascendencia mixta, heredando una fracción de su genoma de ambos ancestros. El valor de K óptimo fue seleccionado entre los más probables utilizando el logaritmo neperiano de la probabilidad ($\ln(P)$) propuesto por el software y la información propuesta por el DeltaK (incremento basado en la tasa de cambio de la probabilidad posterior con respecto al número de grupos) tal como se define en Evanno *et al.* (2005) aplicados en STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt 2012). Los análisis definitivos se llevaron a cabo en cada zona de contacto por separado, cinco veces por cada K, con un período de burnin de 100.000 seguido de 1.000.000 iteraciones por cada análisis de los datos. Se combinaron los valores de las diferentes replicas bajo el valor de K óptimo con CLUMPP (Jakobsson y Rosenberg 2007) y se calculó el porcentaje medio de pertenencia a una u otra especie por cada localidad. Los niveles de mezcla para cada individuo en la muestra se obtuvieron de los análisis independientes correspondientes al valor más probable de K y utilizando el conjunto de datos total (catorce loci) y el conjunto de datos reducido (siete loci), eliminando aquellos marcadores donde se detectó la presencia de alelos nulos. La coherencia de las estimaciones de los parámetros nucleares y mitocondriales fue verificada mediante el análisis gráfico de los resultados. Para estimar la proporción de los miembros de cada localidad a cada uno de los grupos inferidos, se utilizó la fracción de la estima posterior de pertenencia a cada grupo y se presentó gráficamente, junto al mapa de cada zona de contacto, la información obtenida de los análisis nucleares de microsatélites implementados en CLUMPAK (Jakobsson & Rosenberg 2007; Kopelman *et al.* 2015) y de los análisis de RFLP mitocondrial (ver figura 4).

2.4. Análisis de clinas genéticas

Con el propósito de realizar un análisis de gradiente de variación genética entre las localidades de ambas zonas de contacto, se realizaron dos tipos de análisis: uno en base al grado de pertenencia a la especie *P. ibericus* tanto para ADN mitocondrial, como para el conjunto de datos de microsatélites reducido (únicamente con aquellos loci en los cuales fue descartada la presencia de alelos nulos); y un segundo análisis de la frecuencia de aparición de los distintos alelos a lo largo del transecto. De esta manera, para el análisis de clinas del genoma nuclear, se realizó un primer análisis en base al valor medio estimado de pertenencia asignado por STRUCTURE en el conjunto de loci reducido (7 microsatélites); se calculó inicialmente el valor promedio de pertenencia a la especie *P. ibericus* para cada localidad, como previamente se ha descrito, en un total de 14 localidades por transecto. Por otro lado, para el análisis de la clina mitocondrial se calculó igualmente el porcentaje medio de pertenencia a *P. ibericus* por localidad a partir de los datos individuales de RFLP. El conjunto de datos fue usado como medida de la estima multilocus de cada localidad y representado frente a la latitud en base a sus coordenadas geográficas. Para estimar el grado de correspondencia y/o concordancia a lo largo de cada transecto, se realizó un segundo análisis de las frecuencias alélicas para un número de loci

diagnósticos en cada localidad siguiendo el mismo orden, en un gradiente latitudinal, con el objetivo de reflejar los niveles de introgresión nuclear de cada marcador por separado a lo largo del transecto en ambas zonas de contacto. Posteriormente, se utilizó el Análisis de Coordenadas Principales implementado en GeneAlEx para visualizar las diferencias entre poblaciones (F_{st}) con 1000 permutaciones aleatorias de genotipos para testar la significación de los ejes (Figuras 6). En la tabla 6 se recogen los datos del análisis de F_{st} por pares de localidades dentro de cada transecto frente a al valor medio de las distancias genéticas entre localidades (p -distance).

3. Resultados

Del total de 850 muestras genotipadas, fueron seleccionadas para el análisis de las zonas de contacto exclusivamente un total de 797 muestras, procedentes de 72 localidades en el rango comprendido entre *P. atlanticus* (Natla=20), *P. ibericus* (Nibe=28) y *P. hespericus* (Nhesp=29), (Fig. 1, Tabla 1) mientras que el resto, distribuidas mayoritariamente a lo largo del área de presencia de *P. ibericus*, serán usadas para futuros análisis espaciales y Modelos de Distribución de Especies. Las coordenadas geográficas, así como el número de individuos capturados, se muestran en la tabla 1 y se representan en las figuras 1A - Zona de contacto entre *P. ibericus* y *P. atlanticus*; y 1B - zona de contacto entre *P. ibericus* y *P. hespericus*.

3.1. Resultados del análisis de diferenciación en secuencias mitocondriales.

Para el presente estudio fueron usadas un total de 180 secuencias de los fragmentos parciales del gen mitocondrial Citocromo b (mt-CYB) y NAD deshidrogenasa subunidad 4 (mt-ND4), resultando un alineamiento de 1493 pb con 81 haplotipos únicos y 152 sitios variables de los cuales 121 fueron informativos. En la figura 2 se representa una red de haplotipos “*median-joining*” de los linajes mitocondriales con sus respectivas distancias genéticas. Tanto el número de secuencias como las medidas de diversidad genética en el interior de cada linaje mitocondrial están recogidas en la tabla 2. Los resultados coinciden con tres grupos geográficos diferenciados y bien soportados, que se denominan por los nombres específicos propuestos en la presente tesis (*P. atlanticus*, *P. ibericus*, y *P. hespericus*) y se corresponden con los clados A, B y C respectivamente, descritos con anterioridad (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015). En algunas localidades, exclusivamente aquellas situadas en los estrechos límites que separan el rango de distribución de las especies, se produjo la concurrencia de distintos haplotipos mitocondriales. Entre el rango de distribución de las especies *P. atlanticus* y *P. ibericus* las localidades de GRA (Grândola), OLO (Outeiro de Lobo, Beja), XAU (Vale de agua, Beja), CBS (Colos y Bicos, Beja) presentaron mezcla de ambos linajes mitocondriales en simpatria. Sin embargo, únicamente en las localidades de IZN (Iznatoraf, Jaén) y MES (Mestanza, Ciudad Real)

se encontraron los clados mitocondriales en simpatría correspondientes a las especies *P. ibericus* y *P. hespericus*.

3.2. Resultados del análisis de marcadores de evolución rápida: microsatélites

De todos los marcadores publicados hasta el momento para el gen. *Pelodytes* (van de Vliet *et al.* 2008 y Jourdan-Pineau *et al.* 2009) tan solo tres de ellos –PPU2, PPU6 y PPU15–, desarrollados específicamente para *P. punctatus*, y dos desarrollados para el estudio de la zona de contacto de *P. atlanticus* y *P. ibericus* –Ppu 2 y Ppu13– resultaron fallidos en los test previos para un número considerable de localidades siendo, por tanto, eliminados. Finalmente, de los 14 microsatélites amplificados para todas las poblaciones, se seleccionaron únicamente aquellos en los cuales no se encontró evidencia de errores de genotipado, alelos nulos o “dropout”, y un conjunto de siete de ellos fueron usados para los subsiguientes análisis en cada zona de contacto de las especies en estudio (Tabla 4). Todos los loci presentaron un grado de polimorfismo muy alto (>85%) con un número de alelos para todas las poblaciones que varió dentro de un rango desde 17 (Ppu14) hasta 56 (Ppu8) en ambas zonas de contacto. El alelo más frecuente para cada marcador nuclear fue diferente en cada linaje mitocondrial, a excepción del locus menos polimórfico, Ppu14, cuyo alelo más frecuente para los tres linajes fue el mismo con distinto porcentaje: 18.8% para A (*P. atlanticus*), 22% para B (*P. ibericus*) y 24% para C (*P. hespericus*). El locus Ppu1 resultó mayoritariamente monomórfico en las localidades del linaje C (*P. hespericus*: 98%) y bastante frecuente en el B (*P. ibericus*: 71.1%). Varios loci se comportaron de forma muy particular entre pares de linajes mitocondriales: Ppu 3 en la zona de contacto portuguesa (clados A/B) y PPU5 y PPU16 en la zona de contacto española (clados B/C). Pero especialmente hubo tres marcadores (Ppu7, Ppu8 y Ppu10) donde los alelos exhibieron diferencias claras en las frecuencias alélicas para los tres linajes. De ellos, el locus Ppu7 mostró una gráfica evidente de variación entre las tres especies, con frecuencias no coincidentes a lo largo del rango de tamaño de los fragmentos.

En la zona de contacto portuguesa (A/B), de un total de 21 pares de marcadores analizados, 13 mostraron valores de desequilibrio gamético significativos ($P < 0.05$). Tras la corrección de Bonferroni para asociaciones no aleatorias; nueve localidades (CBS, SOL, BMP, BRR, OUR, CAV, VDB, NDB y PEN), pertenecientes a un rango geográfico más o menos estrecho y especialmente cercano a los límites entre los linajes mitocondriales, mostraron valores claramente significativos, mientras que en la zona de contacto española, fueron detectados en tres localidades (IZN, VRO y ACDC) para distintos pares de loci coincidiendo con los límites de distribución de ambas especies.

Por otra parte, el análisis de los datos de todas las poblaciones en conjunto, reveló desviaciones claras del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) inferiores a los límites establecidos por la corrección de

Bonferroni para un umbral de $P < 0.05$. A pesar de las restrictivas condiciones aplicadas bajo esta corrección ($\alpha < 0.0002$) para el conjunto de microsatélites, los análisis específicos de las localidades en ambas zonas de contacto, muestran un rango de localidades amplio, especialmente en áreas cercanas a los límites de distribución de las especies y/o localidades de mezcla de los distintos linajes mitocondriales. En la zona de contacto portuguesa, ocho localidades (CBS, SOL, CVL, BRR, OUR, CAV, NDB y PEN) presentaron valores significativos de desviación de los valores esperados en equilibrio Hardy-Weinberg, mientras que, en la zona de contacto española, resultaron valores claramente significativos las mismas tres localidades (IZN, VRO y ACDC) que en el caso de desequilibrio gamético. A pesar del marcado desequilibrio gamético, éste no se encontró asociado a evidencias en el déficit heterocigótico. Si consideramos el conjunto total de localidades agrupadas por su linaje mitocondrial, todas ellas presentan déficit heterocigótico para el conjunto de marcadores, a excepción únicamente de Ppu6 (en el linaje A) y Ppu14 (en el linaje C). Sin embargo, para cada localidad por separado, en general, el número de heterocigotos se corresponde con lo esperado según el equilibrio HW, detectándose en su mayoría un ligero exceso según lo que cabe esperar de una población en panmixia (valores negativos de la diferencia entre la heterocigosidad esperada y observada) (ver tabla 4). Al contrario, en la zona de contacto portuguesa se encontraron cuatro localidades con valores positivos significativos ($F_{is} > 0$; $p < 0.05$). Excepto en dos localidades, donde fueron significativas para tres loci, el resto presentó déficit de heterocigotos en un solo locus. Las localidades de SLU, TEL, CBS y BRR, detectaron déficit heterocigótico para el conjunto de marcadores tras aplicar la corrección de Bonferroni. En la zona de contacto española, el análisis global en el conjunto de marcadores reveló cuatro localidades con valores significativos ($F_{is} > 0$; $p < 0.05$) de las cuales sólo una (CFB) mostró un déficit de heterocigotos significativo tras la corrección de Bonferroni, mostrando coincidencia con la localidad donde se encontró mezcla (nDNA).

3.3. Resultados del análisis de estructura poblacional

Se estimaron los niveles de diversificación genética y estructura poblacional en todas las localidades a través del análisis múltiple para el conjunto de siete microsatélites y RFLP mitocondrial. Se encontraron valores significativos ($p < 0.001$) en los test de diferenciación genética mediante F_{st} para un amplio número de localidades. Al igual que en análisis anteriores y con la intención de comparar tendencias entre los resultados, se trató de manera diferencial cada zona de contacto, encontrándose dos escenarios de mezcla claramente distintos. Los valores F_{st} más altos se dieron en la zona de contacto entre *P. ibericus* y *P. hespericus*. En las tablas 7 y 8 se muestran los valores de F_{st} para todos los pares de localidades frente a distancias *p-no corregidas* entre pares de secuencias de ADNmt (representadas por el valor promedio intrapoblacional). La zona de contacto española (B/C) mostró valores de F_{st} entre 0 y 0.400 con dos zonas diferenciadas de valores bajos (intraespecíficas) y

mayor estructura entre localidades pertenecientes a distintos clados mitocondriales. De manera especular, se refleja una tendencia similar entre los datos correspondientes a distancias genéticas entre las secuencias mitocondriales cuando son comparados por pares de localidades. Esto sugiere una homogeneidad patente entre los dos grupos poblacionales que coincide con las distribuciones de las dos especies: *P. ibericus* y *P. hespericus*. En el interior del transecto y a partir de la localidad intermedia de VRO, el tránsito desde el rango de distribución propiamente de *P. ibericus* se hace brusco a medida que nos aproximamos al noreste peninsular. Del mismo modo ocurre en el conjunto total de localidades con CFB y HUE. A partir de estas poblaciones el valor de estructura aumenta considerablemente en dirección noreste coincidiendo con el incremento del número medio de diferencias por sitio la distancia media entre todos los pares de secuencias mitocondriales.

Por otro lado, en la zona de contacto portuguesa entre *P. atlanticus* y *P. ibericus*, los valores se movieron en rangos similares entre 0 y 0.322 de forma heterogénea, con una zona intermedia definida por los niveles más altos. A lo largo del transecto (Tabla 6), se encontró una tendencia con valores de diferenciación genética moderados entre pares de localidades. Sin embargo, en las localidades de CID, OLO, XAU y CVL los valores fueron especialmente altos, con independencia del linaje mitocondrial al que pertenecían. De modo contrario, el patrón de diferenciación genética basado en distancias *p-no corregidas* entre pares de secuencias mitocondriales, no corresponde con el observado para los datos nucleares, encontrándose una tendencia clara al aumento entre distintos linajes mitocondriales. A partir de la localidad intermedia de CBS, se encontró un incremento apreciable en los valores de F_{st} en microsatélites y de distancias genéticas entre pares de secuencias, con una tendencia a disminuir a medida que nos alejamos de la zona de contacto. Es decir, se observaron valores mayores de estructura poblacional en el interior del amplio rango de contacto entre linajes que entre localidades del interior del rango de distribución específico de *P. atlanticus* y *P. ibericus*. En concreto, el grupo de localidades del interior que vieron un grado de estructura mayor en el conjunto de localidades (CVL, XAU, OLO y CID), podrían constituir una franja de contacto interespecífica en torno a 36 km, con un considerable nivel de estructura debido a la interrupción del flujo genético. Esto sugiere un grupo poblacional heterogéneo que coincide con el límite de la distribución entre ambos linajes mitocondriales, donde existe un nivel de estructura alto para casi todas las localidades del interior de la zona de contacto. Resulta menos evidente distinguir un centro para las zonas de contacto entre *P. atlanticus* y *P. ibericus*, pudiéndose encontrar en cualquier punto de la franja existente entre las localidades de CBS y CID.

Se estimaron también los valores de F_{st} agrupado en los clados mitocondriales, entre todo el conjunto de secuencias y microsatélites, resultando un grado de diferenciación alto para las primeras, entre 0.929-0.962, y los segundos, entre 0.111 y 0.316, con un valor de significación alto ($p < 0.001$).

Los valores de distancia genética entre los distintos linajes mitocondriales (mt-CYB y mt-ND4) se encuentran indicados en la figura 2 y descritos previamente en capítulos anteriores (16s y mt-CO1).

Los resultados de la AMOVA (tablas 5 y 6) confirman estas diferencias de variación nuclear en el interior de los linajes mitocondriales. Ambas zonas de contacto presentan unas diferencias evidentes cuando se agrupan los individuos de cada localidad por su respectivo clado mitocondrial (RFLP). Aunque gran parte del porcentaje de variación se debe principalmente a las diferencias en el interior de las poblaciones, en el caso de la zona de contacto portuguesa, sólo un 25% es debida a las diferencias entre distintos linajes mitocondriales (linajes A y B); mientras que en la española, aunque existe un componente de variación dentro de cada linaje (B y C), el porcentaje dependiente de las diferencias entre ellos alcanza casi la mitad del total. Cuando se repite el mismo análisis exclusivamente en las localidades del transecto, en el interior de la zona de contacto, la variación entre grupos poblacionales disminuye, haciéndose prácticamente inexistente entre A y B. El análisis principal de Coordenadas (PCoA) no obstante, segrega perfectamente en los ejes principales las localidades pertenecientes a uno y otro grupo poblacional en ambas zonas de contacto (figura 6).

El análisis de cluster bayesiano basado en probabilidades posteriores de STRUCTURE reveló resultados similares, con un K óptimo igual a 2, como el número de grupos más probables en ambas zonas de contacto (figura 3). El valor de K óptimo fue seleccionado entre los más probables por el DeltaK (Evanno *et al.* 2005) aplicados en STRUCTURE HARVESTER (Earl y von Holdt, 2012). Fueron utilizados dos conjuntos de datos diferentes: uno con todos los loci (14) y otro con un número de loci reducidos (7) en base a los resultados del análisis de presencia de alelos nulos y desviación del equilibrio de H-W. Los resultados fueron similares en ambos casos, con excepción de la zona de contacto portuguesa, donde el análisis con el número de loci reducido reveló un porcentaje de mezcla ligeramente inferior. La proporción de la localidad asignada a cada grupo, junto con el mapa, están representados en la figura 3. Los datos coinciden con la información mitocondrial en ambos casos, con algunas diferencias: en la zona de contacto entre los linajes A y B, aunque las localidades donde se detecta mezcla son las mismas, el porcentaje es claramente diferente; en la zona de contacto española, en cambio, las localidades donde se detecta presencia de mezcla entre marcadores nucleares son ligeramente diferentes y en menor proporción que para la información mitocondrial (figura 4). En este último, una parte del porcentaje encontrado parece ser debida a la presencia de individuos migrantes de una a otra área de distribución.

3.4. Análisis clinal

El estudio de las clinas se realizó a través de un transecto en cada zona de contacto, uniendo los rangos de distribución de cada especie. En la figura 5 se pueden apreciar la distinta evolución de las

clinas nuclear y mitocondrial a lo largo del eje de latitud en la zona de contacto occidental. La dirección trazada para el análisis, partiría de un supuesto núcleo al sur, que pudo constituir un refugio glacial, y donde los alelos de cada especie deberían estar fijados para el mayor número de loci. Como en los resultados anteriores, se revelaron dos escenarios muy diferentes. En la zona de contacto española, se puso de manifiesto el bajo grado de flujo génico en el análisis de frecuencia de distintos alelos para cada locus diagnóstico en localidades donde se mantuvo el equilibrio de H-W. En general, se dieron patrones no coincidentes entre los distintos loci, sugiriendo una fuerte estructura, como indican los análisis precedentes, a través de una zona de contacto quebrada con una frecuencia de intercambio de alelos prácticamente inexistente. En base al análisis del valor promedio estimado de pertenencia a cada clado para el conjunto de loci reducido (7 microsatélites), la zona de contacto española mostró escasos niveles de mezcla, pasando rápidamente de un grupo poblacional a otro.

Por el contrario, en la zona de contacto portuguesa, se dieron circunstancias totalmente distintas. El primer análisis reveló la existencia de clinas de variación nuclear concordantes. La franja de contacto, más o menos amplia en comparación con la zona de contacto española, a pesar de tener cierta estructura heterogénea, presentó patrones de frecuencia alélica entre loci diagnósticos con clinas coincidentes características de una zona de tensión (Szymura y Barton, 1986). Al igual que en el caso anterior, en la zona de contacto entre *P. ibericus* y *P. atlanticus*, ambas clinas, obtenidas del análisis nuclear y mitocondrial, presentan una distribución similar al pasar de un área de distribución a otra. No obstante, existen ciertas diferencias en cuanto a la localización geográfica con un área de desfase (36 km) donde los alelos nucleares se mantienen a pesar de la diferenciación mitocondrial.

4. Discusión

El escenario en el que dos clados evolutivos diferenciados ocupan diferentes vertientes en la Península Ibérica no es nuevo. La estructura filogeográfica observada en *Pelodytes*, con dos patrones de distribución, uno atlántico y otro mediterráneo, refleja cierta similitud con otras especies de anfibios y reptiles distribuidos en la península. Salvando las distancias, la distribución de *P. atlanticus* recuerda el caso de los sapos parteros (*Alytes cisternasii*) (Gonçalves *et al.*, 2009), el tritón ibérico (*Lissotriton boscai*) (Martínez-Solano *et al.*, 2006), ranita de San Antonio (*Hyla molleri*) (Stöck *et al.* 2012) y algunas subespecies del género salamandra (*Salamandra salamandra*) (Reis *et al.* 2011) o entre los reptiles la lagartija colilarga (*Psammodromus spp.*) (Fitze *et al.* 2011). De manera análoga, especies de anfibios y reptiles de la vertiente mediterránea: sapillo pintojo (*Discoglossus jeanneae*) (Fromhage *et al.* 2004), la lagartija colilarga (*Psammodromus jeanneae*) (Busack *et al.* 2006), el eslizón ibérico (*Chalcides bedriagai*) (Pleguezuelos *et al.* 2010) o las subespecies del lagarto ocelado (*Timon lepidus nevadensis*) (Miraldo *et al.* 2011) presentan un patrón de distribución mediterráneo al igual que *P. hespericus*. En algunos de estos casos, la fragmentación histórica de las poblaciones ha

originado historias evolutivas independientes y regiones de contacto secundario reciente entre ellas. Sin embargo, la situación original dentro del gen. *Pelodytes* y lo que marca su singularidad, se debe a la existencia de un taxón intermedio entre estas dos distribuciones, de marcado componente ecológico, que condiciona la distinta evolución de los patrones de introgresión e hibridación y nos ofrece la oportunidad de evaluar las relaciones existentes entre grupos evolutivamente diferenciados a lo largo de dos zonas de contacto secundario, oriental y occidental, en el sur de Europa.

4.1. Descripción e identificación de las zonas de contacto

El enfoque multigénico, en base a los resultados del análisis de marcadores nucleares de evolución rápida (microsatélites), nos permitió diferenciar claramente dos situaciones y trazar algunos paralelismos con distintas tipologías de zonas de contacto descritas hasta el momento. La existencia de dos zonas de contacto secundario a consecuencia de la aparente expansión reciente de *P. ibericus* en el sur de la península Ibérica (ver Díaz-Rodríguez *et al*, 2015), da lugar a un escenario diferente según se trate de las especies *P. atlanticus* al oeste, o *P. hespericus* al este.

En el caso de la zona de contacto portuguesa, la existencia de patrones de estructura heterogénea, donde la hibridación está presente, y la ausencia de una diferenciación nuclear clara entre localidades pertenecientes a distintos linajes mitocondriales, evidencian una situación de mezcla reflejada en los marcadores de evolución rápida y estructura poblacional, sobre todo en el interior del rango de distribución de *P. atlanticus*. El contacto secundario y reciente entre linajes marcados por una profunda huella genética, resultado de la fragmentación alopátrica histórica entre ambas especies en el sur de la Península Iberica, pone de manifiesto la existencia de una zona de contacto bimodal y compleja, fruto de la tensión de fuerzas intrínsecas, afectadas de una parte por la inmigración parental y la emigración de genotipos híbridos y de otra por la selección en contra de los híbridos. Esta señal inequívoca de introgresión entre ambas especies indica que el aislamiento reproductivo no se ha completado, probablemente a causa de la ausencia de barreras reproductivas efectivas. Las desviaciones en el equilibrio de H-W y desequilibrio de ligamiento entre marcadores sugieren una franja longitudinal más o menos amplia (36 km) donde se detecta cierta estructura e interrupción del flujo génico. La presencia, aunque escasa, de déficit heterocigótico en localidades donde se encuentran ambos genotipos nucleares o cercanas a esta zona de mezcla (en el interior de *P. atlanticus*), y el número elevado de localidades en desequilibrio de ligamiento, plantea la cuestión de una situación de contacto prolongada en el tiempo donde el déficit de heterocigotos (debido al efecto Wahlund) hubiese colapsado completamente para la mayoría de las localidades pero no así el desequilibrio de ligamiento. La presencia de clinas coincidentes en el espacio para distintos loci diagnósticos, el desequilibrio gamético, así como las estimas de interrupción de flujo génico, son la mejor muestra de selección en contra de los híbridos debido mayoritariamente a factores genéticos intrínsecos que abióticos. Un

análisis espacial de distintas variables ambientales permitiría saber si en esta selección están implicadas también fuerzas extrínsecas determinadas por las condiciones del hábitat. Cabe señalar también, la oportunidad que ofrece evaluar el tipo de fuerzas presentes en esta zona de tensión. Del resultado del análisis acústico de la llamada de apareamiento del macho entre las poblaciones de *P. atlanticus* y *P. ibericus*, no obstante, pueden apreciarse niveles significativos de diferenciación en el número de notas B que forman parte de la secuencia de canto. Esta característica, aunque presente, no supone una prueba de la existencia de una barrera efectiva de aislamiento pre-cigótico, indicando la necesidad de analizar la respuesta y selección de las hembras a la llamada mediante experimentos de fonotaxis que permitan evaluar el efecto de las llamadas de los machos entre ambas especies.

Por otra parte, los análisis de aislamiento por distancia mediante el test de Mantel (resultados no mostrados), tanto en el total de las localidades estudiadas como a través del transecto, muestran la falta de correlación entre las distancias genéticas y geográficas. Obviamente, localidades pertenecientes a distintos linajes se encuentran más próximas entre sí, en el interior de la zona de contacto secundario, que localidades pertenecientes al mismo linaje. La matriz de distancias genéticas basada en los datos de los siete microsatélites no muestra un patrón debido al aislamiento por distancia y, por tanto, ni es la única, ni la principal fuerza que actúa sobre la variación espacial de las frecuencias alélicas. Por el contrario, corrobora la estructura poblacional y la existencia de algún tipo de barrera para la dispersión y el cambio de las frecuencias alélicas en un ambiente selectivo.

Los alelos que presentan variación ancestral debida a segregación incompleta pueden estar representados por igual en ambos clados, por lo tanto, el enfoque multilocus se considera la mejor estima de la estructura de la clina. Las frecuencias utilizadas para generar la clina nuclear multilocus, representan la proporción de miembros de cada localidad de muestreo en cada uno de los grupos poblacionales inferidos (clados) que se calculó utilizando la información de todos los loci microsatélites generada por STRUCTURE. Por lo tanto, la clina utilizando este enfoque es una representación de lo que está sucediendo en el genoma nuclear en su conjunto, en lugar de en un solo locus. El análisis nuclear en su conjunto, muestra, en primer lugar, una transición espacial marcada de un genotipo parental a otro, y en segundo lugar un cierto desfase espacial en contraste con la variación mitocondrial, generando un área donde los haplotipos mitocondriales parecen estar fijados a pesar de la introgresión nuclear. Aunque no se apreciaron diferencias en los anchos de las clinas, la situación espacial entre los datos nucleares y mitocondriales a lo largo del gradiente genético de la zona de contacto divergió, ocupando ambas una franja más o menos amplia en dirección sureste a noroeste pero distanciadas unos 36 km. Aunque es conocido que al entrar en contacto dos grupos poblacionales diferentes partes del genoma pueden responder de manera diferente a la introgresión en función de las fuerzas de selección que actúan directa o indirectamente sobre ellos (Butlin y Hewitt, 1985; Hewitt, 1993), también es cierto que patrones no concordantes entre distintos marcadores pueden ser resultado

de la deriva genética diferencial entre mtDNA y nDNA. Por tanto, esta discrepancia entre marcadores citoplasmáticos y nucleares, pueden ser el resultado de diferencias en la persistencia de polimorfismo ancestral en poblaciones que han seguido trayectorias evolutivas independientes (véase, por ejemplo Pamilo y Nei 1988; Moore 1995). En cualquier caso, a pesar del inicio de introgresión genética detectada entre ambas especies, hasta el momento presente, cualquier co-adaptación de los alelos específicos a cada linaje puede aumentar los efectos de divergencia entre linajes a través de interacciones epistáticas entre loci (Coyne and Orr, 2004). Aunque los nuevos genotipos recombinantes producidos a partir de la hibridación presenten una presión selectiva en su contra, bajo estas condiciones, la epistasis y el ligamiento pueden promover la coincidencia entre clinas (Barton y Hewitt, 1989), que serían el resultado de un contacto prolongado entre las especies en esta región.

El grado de mezcla se distribuye de manera desigual en el norte y sur de la esta zona de contacto, existiendo un gradiente de introgresión patente en el sur del genoma nuclear de *P. ibericus* hacia la costa portuguesa. En estas localidades, pertenecientes mayoritariamente a un elevado número de tribus matriarcales de *P. atlanticus*, la frecuencia de alelos nucleares de *P. ibericus* aumenta de manera considerable en algunos individuos. Por el contrario, en las localidades distribuidas más al norte (Alentejo), la presencia patente de una rama del clado mitocondrial de *P. ibericus* y el aumento relativo de las frecuencias de alelos de *P. atlanticus*, hacen pensar en la introgresión de esta última hacia el interior peninsular. Únicamente en la localidad intermedia de SOL ocurre como en el sur, donde la mayoría de los individuos pertenecen al haplogrupo de *P. atlanticus* (aunque ambos están presentes). A juzgar por la presencia de distintos linajes mitocondriales, la existencia de individuos híbridos, detectados en secuencias nucleares anteriormente descrita (b-fib, PPP3CAint5, KIA y RAG1), y la discordancia citonuclear en las mismas localidades en esa área, desde Grândola hasta las proximidades de Cercal (GRA, OLO, XAU, CBS y SOL), parece patente la ausencia de barreras efectivas de aislamiento reproductivo entre ambos clados. Si consideramos que la dispersión ocurre de la misma manera en ambas especies y que es realizada principalmente por los machos, siendo las hembras más filopátricas, entonces la introgresión de *P. ibericus* por el sur y *P. atlanticus* por el norte estaría desplazando la clina de la variación nuclear conforme se incrementa la latitud y a medida que la presencia del clado mitocondrial de *P. ibericus* aumenta también de oeste a este. En la red de haplotipos puede apreciarse como todos los individuos analizados en el interior del área de contacto pertenecen a la misma rama con algunos haplotipos intermedios y un número restringido de tribus matriarcales de *P. ibericus* distribuidos únicamente en Portugal.

El ejemplo contrario lo constituye la zona de contacto a oriente peninsular. El tránsito desde el rango de distribución de *P. ibericus* se hace brusco a medida que nos aproximamos al noreste, con centro en la localidad de VRO, a partir de la cual se produce un cambio rápido en la estructura poblacional y los patrones de mezcla, tanto del genoma nuclear como mitocondrial (ver figura 5 y

tabla 6), precisamente en el límite inter-comarcal de Andalucía y Castilla-La Mancha. En esta localidad se encuentra claramente el límite y centro de la zona de contacto, mostrándose este punto del transecto como separación de ambas distribuciones en el sur de España. La práctica ausencia de mezcla y ciertos desvíos en el equilibrio H-W en localidades muy determinadas, corrobora la presencia de individuos migrantes detectada en el análisis bayesiano de STRUCTURE y en el análisis de RFLP y sugieren cierta introgresión a pesar de la fuerte estructura. La capacidad de las especies de mantenerse distintas en simpatría, es la prueba determinante para indicar que la especiación entre las dos formas parentales está completada (Jiggins & Mallet, 2000). La zona de contacto quebrada, el flujo génico prácticamente inexistente y la ausencia de clinas no concordantes, ni coincidentes para cada alelo por separado, puesto que cada uno responde de una manera distinta en el espacio en equilibrio H-W, nos hacen pensar en primer lugar en la independencia ancestral de ambos linajes, con barreras efectivas de aislamiento reproductivo, pero también en la existencia de factores ligados al hábitat que determinan en gran medida la distribución de ambos genotipos parentales.

En general, nuestros resultados muestran segregación entre dos patrones que se comportan de manera marcadamente distinta. Estas diferencias detectadas en el momento de nuestro estudio, pueden haber sido originadas por diferentes motivos. En primer lugar, los distintos tiempos de divergencia entre los taxones. En base al estudio filogenético expuesto en el capítulo segundo de esta tesis, el linaje formado por *P. ibericus* y *P. atlanticus* parece haberse diversificado mucho más antiguamente, hace aprox. 3,8 millones de años, mientras que entre *P. hespericus* y *P. punctatus*, nuestras estimas apuntan a hace aprox. 2.3 millones de años. Este escenario de expansión de los linajes hacia el norte en tiempos de diferenciación Pleistocénica, confirmaría nuestra hipótesis de existencia de barreras reproductivas y adaptación diferencial al hábitat en el caso de *P. ibericus* y *P. hespericus*. Las diferencias significativas encontradas en la composición del canto en *P. hespericus*, muy distinta de los otros tres linajes, estaría marcando un posible factor de aislamiento reproductivo pre-cigótico o al menos, la diferenciación a nivel específico de un carácter marcadamente ligado al reconocimiento mutuo y la reproducción. Para evaluar el papel biológico de este carácter y su influencia en la especiación es necesario, como exponíamos anteriormente, el estudio de la respuesta de las hembras a la llamada de apareamiento entre machos pertenecientes a ambas especies. Por otra parte, el patrón encontrado en las zonas de contacto analizadas, también puede estar influido por diferencias a nivel de adaptación ecológica al hábitat. Además de la evidente segregación fenológica entre las especies, muy patente entre las poblaciones de *P. ibericus* y *P. hespericus* de la zona de contacto oriental, existen diferencias en el tipo de hábitat reproductivo de las especies, más temporal y efímero en el caso de *P. ibericus* y *P. atlanticus*, que en *P. hespericus* donde tiende a reproducirse en charcas y arroyos variables, más permanentes. En la zona de contacto española *P. ibericus* tendería a ocupar regiones altitudinales más bajas mientras que *P. hespericus* se distribuiría a más altitud, mostrando preferencia por cierto tipo de suelos (evitando sustratos calizos) (Sánchez-Herráiz, 2004). Un análisis exhaustivo,

tanto del área de distribución como de las zonas de contacto, ligada a los diferentes hábitats y la especificidad de nicho ecológico mediante Modelos de Distribución de Especies, contribuiría al conocimiento de la especiación dentro de este complejo críptico de especies y a esclarecer, por otra parte, la situación actual de las poblaciones del género *Pelodytes*, muchas de ellas en evidente retroceso debido a la fragmentación y pérdida de hábitats.

En resumen, el presente estudio de caracterización genética, viene de este modo a contribuir al conocimiento de las especies del género, la dinámica de diferenciación y expansión post-glacial y, en general, a detallar la situación de los rangos de distribución actuales en la Península Ibérica. Como es el caso de otros anfibios ibéricos, las especies descritas en la actualidad formarían parte de un escenario mucho más complejo, en el que se están dando fenómenos de hibridación, por contacto secundario, y cuyo estudio de los límites de distribución exactos se han planteado en esta tesis. Por las razones anteriormente citadas, las especies pertenecientes a este grupo de anfibios son sujetos idóneos para examinar aspectos ecológicos e identificar diferencias de nicho, fundamental para comprender en profundidad el proceso de especiación y poder esclarecer algunas de las incógnitas que han determinado sus historias evolutivas. La urgencia de su estudio adquiere, además un cariz especial en la situación actual de desaparición de hábitats reproductivos especialmente en las poblaciones de *P. atlanticus* (Beja y Alcázar, 2003).

Referencias

- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, New York.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Barton, N. H., & Hewitt, G. M. (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual review of Ecology and Systematics*, 113-148.
- Barton, N. H., & Hewitt, G. M. (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341(6242), 497-503.
- Beja, P., & Alcazar, R. (2003). Conservation of Mediterranean temporary ponds under agricultural intensification: an evaluation using amphibians. *Biological Conservation*, 114(3), 317-326.
- Butlin, R. K., & Hewitt, G. M. (1985). A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): behavioural characters. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26(3), 287-299.
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3), 621-631.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Dempster, A. P., Laird, N. M., & Rubin, D. B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the royal statistical society. Series B (methodological)*, 1-38.
- Díaz-Rodríguez, J., Gonçalves, H., Sequeira, F., Sousa-Neves, T., Tejedo, M., Ferrand, N. & Martínez-Solano, I. (2015) Molecular evidence for cryptic candidate species in Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 224-241.
- Earl, D.A. & von Holdt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Fitze, P.S., Gonzalez-Jimena, V., San-Jose, L.M., San Mauro, D., Aragon, P., Suarez, T., Zardoya, R., (2011). Integrative analyses of speciation and divergence in *Psammotromus hispanicus* (Squamata: Lacertidae). *BMC Evol Biol* 11, 347.
- Fromhage, L., Vences, M., y Veith, M. (2004). Testing alternative vicariance scenarios in Western Mediterranean discoglossid frogs. *Molecular phylogenetics and evolution*, 31(1), 308-322.
- Gómez, A., Lunt, D., (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. *Phylogeography in Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity* 155-188.
- Gonçalves, H., Martínez-Solano, I., Pereira, R.J., Carvalho, B.M., García-París, M., Ferrand, N., (2009). High levels of population subdivision in a morphologically conserved Mediterranean toad (*Alytes cisternasii*) result from recent, multiple refugia: evidence from mtDNA, microsatellites and nuclear genealogies. *Molecular Ecology* 18, 5143-5160.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hampe, A., y Petit, R. J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology letters*, 8(5), 461-467.
- Harrison R.G. (1990) *Hybrid Zones: Windows on the Evolutionary Process*. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7, 69-128.
- Hewitt, G. M. (1988). Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology & Evolution*, 3(7), 158-167.
- Hewitt, G. M. (1993). Postglacial distribution and species substructure: lessons from pollen, insects and hybrid zones. *Evolutionary patterns and processes*, 14, 97-123.
- Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society*, 58 (3), 247-276.
- Hewitt, G. M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1-2), 87-112.
- Hewitt, G. M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular ecology*, 10(3), 537-549.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359 (1442), 183-195.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000) Preparation of PCR quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques*. 29:52-54
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. & Wilson A.C. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular and Evolution*, 32, 128-144.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801-1806.
- Jiggins, C. D., y Mallet, J. (2000). Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology y Evolution*, 15(6), 250-255.

- Jourdan-Pineau, H., Nicot, A., Dupuy, V., David, P., & Crochet, P. A. (2009). Development of eight microsatellite markers in the parsley frog (*Pelodytes punctatus*). *Molecular ecology resources*, 9(1), 261-263.
- Jourdan-Pineau, H., David, P. & Crochet, P.A. (2012) Phenotypic plasticity allows the Mediterranean parsley frog *Pelodytes punctatus* to exploit two temporal niches under continuous gene flow. *Molecular Ecology*, 21, 876–886.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. & Mayrose, I. (2015) CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1179–1191.
- Martínez-Solano, I., Teixeira, J., Buckley, D., García-París, M., (2006). Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology* 15, 3375–3388.
- Miraldo, A., Hewitt, G. M., Paulo, O. S., & Emerson, B. C. (2011). Phylogeography and demographic history of *Lacerta lepida* in the Iberian Peninsula: multiple refugia, range expansions and secondary contact zones. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 170.
- Moore WS (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. *Evolution*, 49, 718-726.
- Moritz, C., Schneider, C.J., & Wake, D.B. (1992) Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, 41, 273–291.
- Pamilo P, Nei M (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 568-583.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539.
- Pleguezuelos, J. M., Sá-Sousa, P., Pérez-Mellado, V., Marquez, R., y Martínez-Solano, I. (2010). *Chalcides bedriagai*.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Reis, D.M., Cunha, R.L., Patrão, C., Rebelo, R., Castilho, R., (2011). *Salamandra salamandra* (Amphibia: Caudata: Salamandridae) in Portugal: not all black and yellow. *Genetica* 139, 1095–1105.
- Rice, W. R. (1989). The sequential Bonferroni test. *Evolution*, 43, 223-225.
- Roček, Z. & Rage, J.C. (2000) Tertiary Anura of Europe, Asia, Africa, Asia, North America, and Australia. In: Heatwole, H., Carroll, R.L. (Eds.), *Amphibian Biology*. Surrey Beatty, Chipping Norton, pp.1332–13 87.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.
- Salzburger, W., Ewing, G.B. & Von Haeseler, A. (2011) The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20, 1952–1963.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sánchez-Herráiz, M.J. (2004) Análisis de la diferenciación genética, morfológica y ecológica asociadas a la especiación en el género *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sánchez-Herráiz, M., Barbadillo, L., Machordom, A. & Sanchíz, B. (2000) A new species of pelodytid frog from the Iberian Peninsula. *Herpetologica*, 56, 105–118.
- Sanchíz, B. (1998a) *Salientia. Handbuch der Paläoherpetologie Pars 4*. Dr. F. Pfeil, Munich.
- Silvestro, D. & Michalak, I. (2010) RAXML GUI: a graphical front-end for RAXML. <<http://sourceforge.net/projects/raxmlgui/>> (accessed 1 November 2015)
- Stamatakis, A. (2006) RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688–2690.
- Stöck, M., Dufresnes, C., Litvinchuk, S. N., Lymberakis, P., Biollay, S., Berroneau, M., ... & Perrin, N. (2012). Cryptic diversity among Western Palearctic tree frogs: Postglacial range expansion, range limits, and secondary contacts of three European tree frog lineages (*Hyla arborea* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 1-9.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., y Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology*, 7(4), 453-464.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- van de Vliet, M. S., Diekmann, O. E., Serrao, E. T., & Beja, P. (2009). Highly polymorphic microsatellite loci for the Parsley frog (*Pelodytes punctatus*): characterization and testing for cross-species amplification. *Conservation genetics*, 10(3), 665-668.
- van de Vliet, M.S., Beebee, T.J. & Diekmann, O.E., (2012) Genetic evidence for a distinct *Pelodytes* lineage in southwest Portugal: implications for the use of pre-developed microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 13, 605–611.
- van de Vliet, M.S., Beebee, T.J., Diekmann, O.E., (2012). Genetic evidence for a distinct *Pelodytes* lineage in southwest Portugal: implications for the use of pre-developed microsatellite markers. *Conserv. Genet.* 13, 605–611.
- Weir 1996
- Weiss, S., Ferrand, N., 2007. *Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer, Netherlands.

Tabla 1. Localidades muestreadas y analizadas para el conjunto de microsatélites, RFLP y secuencias mitocondriales (mt-CYB y mt-ND4). POP= identificador de la localidad; N=número de individuos muestreados; mtDNA=linaje mitocondrial; Nseq=Número de secuencias.

ID	POP	N	mtDNA	Nseq	Locality	Province	Country	X	Y
1	MIN	3	A	2	Mindelo	Porto	Portugal	41,303	-8,708
2	CAN	2	A	4	Cantanhede	Coimbra	Portugal	40,334	-8,600
3	BEN	5	A	0	Benfica	Lisboa	Portugal	38,761	-9,212
4	CA	2	A	1	Cacém	Lisboa	Portugal	38,779	-9,312
5	CAS	5	A	0	Cascais	Lisboa	Portugal	38,706	-9,467
6	VMF	9	A	4	Vila Nova de Milfontes	Odemira	Portugal	37,716	-8,766
7	SLU	23	A	3	Sao Luís	Odemira	Portugal	37,718	-8,713
8	CVL	20	A	2	Cavaleiros	Odemira	Portugal	37,636	-8,763
9	BMP	20	A	3	Bemposta	Odemira	Portugal	37,603	-8,609
10	TEL	15	A	9	Vale da Telha, Aljezur	Aljezur	Portugal	37,298	-8,841
11	VDB	20	A	6	Vila do Bispo	Faro	Portugal	37,117	-8,891
12	NDB	33	A	2	Nave do Barao	Faro	Portugal	37,219	-8,050
13	PEN	29	A	4	Penina	Faro	Portugal	37,248	-8,111
14	BRR	20	A	2	Barreiros	Sao Marcos da Serra	Portugal	37,388	-8,314
15	XAU	9	A/B	3	Vale de Agua	Santiago do Cacém	Portugal	37,918	-8,549
16	OLO	12	A/B	3	Outeiro do Lobo	Santiago do Cacém	Portugal	38,008	-8,527
17	CBS	35	A/B	10	Colos - Bicos	Odemira	Portugal	37,801	-8,551
18	CID	11	A/B	2	Cidrao, Grândola	Ferreira do Alentejo	Portugal	38,121	-8,562
19	GRA	7	A	4	Grândola	Setúbal	Portugal	38,144	-8,569
20	SOL	14	A/B	3	Soalneira	Odemira	Portugal	37,759	-8,511
21	CAH	7	A	1	Canhestros	Ferreira do Alentejo	Portugal	38,040	-8,267
22	RMT	2	B	1	Monte do Trigo	Beja	Portugal	38,404	-7,732
23	RMO	7	B	2	Rio de Moinhos, Aljustrel	Beja	Portugal	37,885	-8,193
24	AEL	8	B	2	Aldeia dos Elvas, Aljustrel	Beja	Portugal	37,812	-8,283
25	OUR	22	B	3	Ourique	Beja	Portugal	37,669	-8,263
26	CAV	16	B	3	Castro Verde	Beja	Portugal	37,744	-8,006
27	ARU	7	B	2	Alcaria Ruiva, Mértola	Beja	Portugal	37,707	-7,786
28	SED	2	B	2	Sedas	Castro Marim	Portugal	37,537	-7,599
29	GLB	7	B	3	Los Barros	Alburquerque	Portugal	39,125	-7,061
30	NSE	7	B	1	Ouguela	Campo Mayor	Portugal	39,080	-7,026
31	CQU	7	B	1	Casa Quemada, Sanlúcar La Mayor	Sevilla	Spain	37,405	-6,242
32	ATA	4	B	2	Cantera de la Atalaya, Montellano	Sevilla	Spain	36,950	-5,810
33	TRE	4	B	4	Trebujena	Cádiz	Spain	36,859	-6,188
34	JER	4	B	3	Jeréz	Cádiz	Spain	36,656	-6,168
35	FAC	3	B	0	Fuentes de Andalucía - La Campana	Sevilla	Spain	37,485	-5,359
36	GRZ	11	B	3	Grazalema	Cádiz	Spain	36,741	-5,342
37	TOB	4	B	2	Toba	Córdoba	Spain	-4,902	-4,902
38	CBR	4	B	1	Cabra	Córdoba	Spain	37,513	-4,361

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS (Pelodytes spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

39	ZAF	3	B	4	Llanos del puerto, Zafarraya	Granada	Spain	36,996	-4,156
40	API	2	B	0	Arroyo Los Pilones, Almogía	Málaga	Spain	36,858	-4,558
41	VIL	2	B	2	Vilches	Jaén	Spain	38,144	-3,543
42	ARQ	11	B	2	Arquillos	Jaén	Spain	38,144	-3,543
43	JAE	18	B	1	Úbeda	Jaén	Spain	38,023	-3,414
44	SAN	8	B	3	Santisteban del Puerto	Jaén	Spain	38,218	-3,278
45	IZN	57	B/C	4	Iznatoraf	Jaén	Spain	38,148	-3,030
46	BEA	9	B	2	Beas	Jaén	Spain	38,277	-2,946
47	ALD	11	B	2	Aldeaquemada - Venta de los Santos, Montizón	Jaén	Spain	38,377	-3,093
48	CFB	32	B/C	4	Cortijo de Fuentebella. Puebla de Don Fadrique	Granada	Spain	38,040	-2,458
49	VRO	48	C	4	Villarodrigo	Jaén/Albacete	Spain	38,495	-2,715
50	HUE	8	C	1	Huescar	Granada	Spain	37,979	-2,490
51	SPO	12	B/C	2	Santiago-Pontones. Cañada Rincón.	Granada	Spain	38,011	-2,738
52	ACDC	19	C	3	Artuñido - Casas de Carrasco	Jaén	Spain	38,119	-2,692
53	MOR	6	C	0	Moratalla	Granada	Spain	38,039	-2,282
54	LORC	2	C	1	Rambla de las Fuentes, Lorca	Murcia	Spain	37,758	-1,978
55	AGU	5	C	2	Águilas	Almeria	Spain	37,558	-1,874
56	REO	13	C	1	Reolid, Salobre	Albacete	Spain	38,616	-2,576
57	ALC	9	C	3	Río Alcaráz	Albacete	Spain	38,663	-2,536
58	BON	7	C	2	Navalucía, El bonillo	Albacete	Spain	38,915	-2,598
59	AYHOR	9	C	3	Loma del Pelao, El bonillo	Albacete	Spain	38,915	-2,598
60	RUI	7	C	1	Laguna Tinaja, Ruidera	Albacete	Spain	38,926	-2,833
61	OMO	3	C	1	Osa de Montiel	Albacete	Spain	39,001	-2,687
62	LEZa	7	C	2	Cañada de Santo Domingo, Lezuza	Albacete	Spain	39,031	-2,320
63	LEZb	7	C	2	Cañada de las colmenas, Lezuza	Albacete	Spain	39,024	-2,376
64	HIG	4	C	2	Higueruela	Albacete	Spain	38,970	-1,427
65	SMA	15	C	7	Santa María - Cañamares	Ciudad Real	Spain	38,737	-2,755
66	CAD	5	C	2	Torre de Juan Abad	Ciudad Real	Spain	38,602	-3,101
67	CAL	9	C	2	Campo de Calatrava	Ciudad Real	Spain	38,658	-3,843
68	MES	9	B/C	5	Mestanza	Ciudad Real	Spain	38,601	-4,024
69	CAB	2	C	2	Parque Nacional de Cabañeros	Ciudad Real	Spain	39,287	-4,334
70	TIR	7	C	4	Tirteafuera	Ciudad Real	Spain	38,738	-4,050
71	DAI	5	C	2	Tablas de Daimiel	Ciudad Real	Spain	39,142	-3,690
72	PP	6	C	1	Ciempozuelos, Valdemoro	Madrid	Spain	40,128	-3,625

Tabla 2. Análisis estadístico de polimorfismo mitocondrial en 180 secuencias para los marcadores mt-CYB y mt-ND4, agrupadas por linaje: n=número de secuencias; h=haplotipos mitocondriales; s=número de sitios variables; π =indicador de la diversidad nucleotídica; Hd=indicador de la diversidad haplotípica.

		n	h	Haplotypes	s	π	Hd
Total		180	81		152	0.02704±0.00029	0.963±0.007
P. atlanticus	A	50	30	H1-30	44	0.00307±0.00024	0.967±0.011
P. ibericus	B	67	27	H31-57	34	0.00148±0.00019	0.859±0.038
P. hespericus	C	63	24	H58-81	29	0.00159±0.00016	0.873±0.035

Tabla 3. Información de los haplotipos detectados y diversidad genética en las localidades incluidas en ambos transectos. POP= identificador de la localidad; n=número de individuos muestreados; h=haplotipos mitocondriales encontrados; s=número de sitios variables; π =indicador de la diversidad nucleotídica.

	POP	n	h	Haplotypes	s	π
Portugal Transect	GLB	4	2	H37, H42	3	0.00134±0.00041
	RMT	1	1	H32	0	0
	CID	2	1	H39	0	0
	GRA	4	4	H5, H13, H37, H43	68	0.02992±0.00890
	OLO	3	2	H14, H35	65	0.02902±0.01368
	XAU	3	2	H6, H52	66	0.02947±0.01389
	CBS	10	5	H6, H15, H16, H17, H35	72	0.01718±0.00672
	SLU	3	2	H5, H6	1	0.00045±0.00021
	VMF	4	3	H2, H3, H4	7	0.00279±0.00074
	CVL	2	1	H7	0	0
	BMP	3	3	H8, H9, H10	5	0.00223±0.00063
	BRR	2	2	H11, H12	2	0.00134±0.00067
	TEL	6	6	H5, H20, H21, H22, H23, H24	14	0.00272±0.00045
Spain Transect						
	ARQ	2	1	H54	0	0
	JAE	1	1	H32	0	0
	SAN	3	2	H32, H55	1	0.00045±0.00021
	IZN	4	3	H32, H44, H69	62	0.02076±0.01080
	ALD	2	1	H32	0	0
	BEA	2	1	H32	0	0
	VRO	4	2	H61, H77	1	0.00045±0.00014
	SMA	7	4	H61, H75, H80, H81	3	0.00057±0.00019
	REO	1	1	H61	0	0
	RUI	4	3	H77, H78, H79	3	0.00123±0.00035
	ALC	3	2	H60, H61	2	0.00089±0.00042
	AYHOR	3	2	H62, H63	1	0.00045±0.00021
	BON	2	1	H64	0	0
LEZ	4	2	H61, H70	1	0.00045±0.00014	

Tabla 4. Medidas de la diversidad genética de 7 microsateélites en *Pelodytes* spp. N= número de muestras; Na= alelos detectados; Ne= número de alelos efectivos; Heterocigosidad esperada (HE) y observada (HO).

Pop	Locu s	Ppu1	Ppu3	Ppu6	Ppu7	Ppu8	Ppu1 0	Ppu1 4	Pop	Locu s	Ppu1	Ppu7	Ppu8	Ppu1 0	Ppu1 4	PPU 5	PPU 16	
MIN	N	2	3	3	2	3	3	3	TOB	N	4	4	4	4	4	4	4	
	Na	2	3	5	2	4	1	3		Na	2	4	5	4	4	4	4	7
	Ne	1,600	2,571	4,500	1,600	3,600	1,000	2,571		Ne	1,280	2,909	4,000	3,556	2,909	3,556	6,400	
	Ho	0,500	0,667	0,667	0,500	1,000	0,000	0,667		Ho	0,250	0,250	0,750	1,000	0,750	0,750	0,750	
	He	0,375	0,611	0,778	0,375	0,722	0,000	0,611	He	0,219	0,656	0,750	0,719	0,656	0,719	0,844		
CAN	N	2	2	2	2	2	2	2	CBR	N	4	4	3	3	4	3	4	
	Na	1	2	2	4	3	1	4		Na	2	6	6	4	4	2	7	
	Ne	1,000	2,000	2,000	4,000	2,667	1,000	4,000		Ne	1,280	5,333	6,000	3,000	2,909	1,800	6,400	
	Ho	0,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,000	1,000		Ho	0,250	1,000	1,000	0,667	0,750	0,000	1,000	
	He	0,000	0,500	0,500	0,750	0,625	0,000	0,750	He	0,219	0,813	0,833	0,667	0,656	0,444	0,844		
BEN	N	5	4	5	5	5	5	5	ZAF	N	3	3	3	3	3	3	3	
	Na	4	4	4	9	6	6	5		Na	1	3	4	3	4	3	2	
	Ne	3,571	3,556	2,941	8,333	5,000	5,000	4,545		Ne	1,000	3,000	3,600	3,000	3,600	2,571	1,800	
	Ho	0,800	0,250	0,200	1,000	0,600	0,400	0,800		Ho	0,000	1,000	0,667	0,667	1,000	1,000	0,667	
	He	0,720	0,719	0,660	0,880	0,800	0,800	0,780	He	0,000	0,667	0,722	0,667	0,722	0,611	0,444		
CA	N	1	2	2	2	2	2	1	API	N	2	2	1	1	2	2	2	
	Na	2	1	4	4	3	3	2		Na	1	4	1	1	3	2	4	
	Ne	2,000	1,000	4,000	4,000	2,667	2,667	2,000		Ne	1,000	4,000	1,000	1,000	2,667	1,600	4,000	
	Ho	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000		Ho	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,500	1,000	
	He	0,500	0,000	0,750	0,750	0,625	0,625	0,500	He	0,000	0,750	0,000	0,000	0,625	0,375	0,750		
CAS	N	4	4	5	4	5	5	5	VIL	N	2	2	2	2	2	2	2	
	Na	6	4	5	7	7	4	6		Na	2	3	3	3	2	3	2	
	Ne	5,333	3,556	3,846	6,400	6,250	2,941	4,545		Ne	1,600	2,667	2,667	2,667	1,600	2,667	2,000	
	Ho	0,750	0,500	0,200	0,750	0,600	0,800	0,600		Ho	0,500	0,500	1,000	1,000	0,500	0,500	1,000	
	He	0,813	0,719	0,740	0,844	0,840	0,660	0,780	He	0,375	0,625	0,625	0,625	0,375	0,625	0,500		
VMF	N	9	9	9	9	9	9	9	ARQ	N	11	11	11	11	11	11	11	
	Na	5	6	5	6	6	6	5		Na	2	9	8	7	8	5	5	
	Ne	3,115	3,522	3,240	4,909	2,793	4,050	3,682		Ne	1,766	4,566	6,050	5,042	6,368	2,241	3,559	
	Ho	0,889	1,000	0,778	1,000	0,778	0,667	0,667		Ho	0,455	0,818	0,636	1,000	1,000	0,636	0,818	
	He	0,679	0,716	0,691	0,796	0,642	0,753	0,728	He	0,434	0,781	0,835	0,802	0,843	0,554	0,719		
SLU	N	23	20	21	23	21	21	22	JAE	N	18	18	15	18	16	18	18	
	Na	7	10	12	11	15	12	10		Na	3	8	11	10	9	7	6	
	Ne	2,075	6,557	6,785	7,896	6,255	9,000	5,628		Ne	1,785	2,623	8,182	7,448	6,169	1,851	3,503	
	Ho	0,304	0,800	1,000	0,783	0,952	0,905	0,773		Ho	0,556	0,667	0,933	0,889	0,813	0,389	0,667	
	He	0,518	0,848	0,853	0,873	0,840	0,889	0,822	He	0,440	0,619	0,878	0,866	0,838	0,460	0,715		
CVL	N	20	20	20	20	20	20	20	SAN	N	8	8	7	8	7	8	8	
	Na	4	5	3	3	2	3	3		Na	2	7	6	7	5	3	6	
	Ne	3,828	4,000	2,667	2,446	1,882	2,632	2,768		Ne	1,133	3,282	4,455	4,000	3,920	1,855	3,765	
	Ho	1,000	1,000	1,000	0,700	0,450	1,000	0,400		Ho	0,125	0,500	0,714	0,750	0,857	0,625	0,875	
	He	0,739	0,750	0,625	0,591	0,469	0,620	0,639	He	0,117	0,695	0,776	0,750	0,745	0,461	0,734		
BMP	N	19	20	20	20	20	20	20	IZN	N	56	57	55	54	57	55	57	
	Na	9	10	7	9	11	5	7		Na	2	9	11	8	6	2	5	
	Ne	4,034	7,619	5,926	7,547	8,000	4,040	4,651		Ne	1,018	1,962	4,979	3,377	3,455	1,997	3,924	
	Ho	0,842	0,950	1,000	0,950	1,000	1,000	0,800		Ho	0,018	0,491	0,909	0,778	0,719	0,382	0,825	
	He	0,752	0,869	0,831	0,868	0,875	0,753	0,785	He	0,018	0,490	0,799	0,704	0,711	0,499	0,745		
TEL	N	12	13	15	13	15	15	15	BEA	N	6	9	9	7	9	9	9	
	Na	15	8	10	12	14	10	10		Na	3	3	5	6	3	3	4	
	Ne	12,52 2	6,377	7,377	10,56 3	4,639	6,618	6,923		Ne	2,182	1,906	3,522	4,455	2,945	1,256	2,348	
	Ho	0,917	0,846	0,867	0,923	0,600	0,733	0,733		Ho	0,500	0,333	0,889	0,857	0,667	0,222	0,778	
	He	0,920	0,843	0,864	0,905	0,784	0,849	0,856	He	0,542	0,475	0,716	0,776	0,660	0,204	0,574		
VDB	N	18	19	20	19	17	20	20	ALD	N	11	11	10	11	10	10	10	
	Na	13	9	9	12	14	9	9		Na	2	6	5	5	5	2	5	
	Ne	10,12	7,293	6,723	8,805	9,031	5,714	6,780		Ne	1,095	3,781	3,774	4,172	3,922	1,600	3,448	

ANÁLISIS GENÉTICO DE DOS ZONAS DE CONTACTO SECUNDARIO EN EL SUR DE LA PENÍNSULA

		5															
	Ho	0,833	0,737	0,950	0,947	1,000	0,850	0,600		Ho	0,091	0,818	0,900	0,909	0,500	0,500	1,000
	He	0,901	0,863	0,851	0,886	0,889	0,825	0,853		He	0,087	0,736	0,735	0,760	0,745	0,375	0,710
NDB	N	31	27	32	33	33	31	31	CFB	N	32	32	29	32	31	28	31
	Na	15	11	10	10	21	9	12		Na	2	17	23	14	9	11	16
	Ne	11,57 8	7,477	7,969	6,764	15,02 1	6,939	8,179		Ne	1,133	8,943	15,57 4	7,699	4,891	7,226	7,877
	Ho	0,871	0,815	1,000	0,848	0,909	0,742	0,839		Ho	0,000	0,906	0,931	0,844	0,839	0,750	0,710
	He	0,914	0,866	0,875	0,852	0,933	0,856	0,878		He	0,117	0,888	0,936	0,870	0,796	0,862	0,873
PEN	N	28	27	27	28	25	27	28	VRO	N	48	46	42	45	46	47	47
	Na	9	7	7	10	10	8	7		Na	1	11	11	9	7	5	5
	Ne	3,492	4,796	4,959	5,985	6,219	4,673	5,407		Ne	1,000	6,364	6,657	5,525	5,489	2,722	4,148
	Ho	0,714	0,815	0,852	0,964	0,720	0,778	0,964		Ho	0,000	0,935	0,976	0,778	0,870	0,681	0,702
	He	0,714	0,791	0,798	0,833	0,839	0,786	0,815		He	0,000	0,843	0,850	0,819	0,818	0,633	0,759
BRR	N	19	19	20	19	20	20	20	HUE	N	8	8	8	7	8	8	8
	Na	7	7	8	5	7	6	5		Na	2	10	13	7	7	9	10
	Ne	5,232	4,719	3,687	2,876	4,848	2,581	3,463		Ne	1,133	7,529	10,66 7	4,667	4,414	7,529	7,111
	Ho	0,895	1,000	0,750	1,000	0,800	0,600	0,450		Ho	0,125	1,000	1,000	0,857	0,875	1,000	0,750
	He	0,809	0,788	0,729	0,652	0,794	0,613	0,711		He	0,117	0,867	0,906	0,786	0,773	0,867	0,859
XAU	N	9	9	9	9	9	9	9	SPO	N	12	12	12	12	12	12	12
	Na	4	3	4	5	3	4	3		Na	1	7	6	7	5	5	6
	Ne	2,455	1,976	3,306	3,951	2,418	3,600	2,219		Ne	1,000	4,800	3,512	5,434	3,600	2,504	3,429
	Ho	0,667	0,444	0,889	0,889	0,333	0,778	0,556		Ho	0,000	0,750	0,667	0,750	0,750	0,667	0,750
	He	0,593	0,494	0,698	0,747	0,586	0,722	0,549		He	0,000	0,792	0,715	0,816	0,722	0,601	0,708
OLO	N	12	12	12	12	12	12	12	ACD C	N	19	19	19	19	19	19	19
	Na	4	4	4	7	6	3	6		Na	1	7	10	6	4	6	8
	Ne	3,097	2,969	2,420	5,236	4,800	1,674	4,645		Ne	1,000	3,665	6,876	4,034	3,422	4,912	3,665
	Ho	0,750	0,917	0,833	1,000	1,000	0,500	0,833		Ho	0,000	0,842	0,947	0,684	0,895	0,895	0,632
	He	0,677	0,663	0,587	0,809	0,792	0,403	0,785		He	0,000	0,727	0,855	0,752	0,708	0,796	0,727
CBS	N	35	33	35	35	33	35	34	MO R	N	6	6	6	6	6	6	5
	Na	8	12	8	11	15	12	8		Na	1	8	6	7	4	3	4
	Ne	2,539	6,135	5,094	6,882	8,127	6,397	5,558		Ne	1,000	7,200	3,273	5,143	3,429	1,674	2,941
	Ho	0,457	0,909	0,943	0,829	0,818	0,886	0,765		Ho	0,000	1,000	0,833	0,667	0,833	0,167	0,600
	He	0,606	0,837	0,804	0,855	0,877	0,844	0,820		He	0,000	0,861	0,694	0,806	0,708	0,403	0,660
CID	N	11	11	11	11	11	11	11	LOR C	N	2	2	2	2	2	2	2
	Na	5	4	3	6	5	4	4		Na	1	3	4	3	3	2	3
	Ne	4,246	2,180	1,847	4,400	4,481	1,613	2,988		Ne	1,000	2,667	4,000	2,667	2,667	1,600	2,667
	Ho	1,000	0,727	0,636	1,000	0,909	0,364	0,909		Ho	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000
	He	0,764	0,541	0,459	0,773	0,777	0,380	0,665		He	0,000	0,625	0,750	0,625	0,625	0,375	0,625
GRA	N	6	6	6	6	6	7	7	AGU	N	5	5	5	5	5	5	5
	Na	5	6	4	7	10	6	4		Na	1	5	4	4	5	7	5
	Ne	3,600	4,500	3,600	6,545	9,000	4,667	2,970		Ne	1,000	3,846	2,381	2,381	4,167	6,250	3,846
	Ho	0,667	1,000	1,000	1,000	0,833	0,857	0,857		Ho	0,000	0,600	0,800	0,600	1,000	0,800	1,000
	He	0,722	0,778	0,722	0,847	0,889	0,786	0,663		He	0,000	0,740	0,580	0,580	0,760	0,840	0,740
SOL	N	14	14	14	14	14	14	14	REO	N	13	13	13	13	13	13	13
	Na	12	8	8	9	12	10	8		Na	1	4	4	3	4	2	4
	Ne	8,522	6,644	5,227	6,426	9,561	5,851	5,600		Ne	1,000	3,347	2,467	1,910	2,504	1,899	3,414
	Ho	0,857	0,929	1,000	1,000	1,000	0,714	0,857		Ho	0,000	0,923	0,615	0,615	0,692	0,769	0,692
	He	0,883	0,849	0,809	0,844	0,895	0,829	0,821		He	0,000	0,701	0,595	0,476	0,601	0,473	0,707
CAH	N	7	7	7	7	7	7	7	ALC	N	9	9	9	9	9	9	9
	Na	2	6	6	3	6	4	4		Na	1	12	12	5	7	5	4
	Ne	1,324	5,158	3,161	2,649	4,667	3,161	3,267		Ne	1,000	10,12 5	9,529	2,314	5,400	1,841	2,656
	Ho	0,286	1,000	0,714	0,714	1,000	0,714	0,714		Ho	0,000	0,889	0,778	0,556	0,889	0,333	0,556
	He	0,245	0,806	0,684	0,622	0,786	0,684	0,694		He	0,000	0,901	0,895	0,568	0,815	0,457	0,623
RM T	N	2	2	2	2	2	2	2	BON	N	7	6	7	7	7	7	7

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILOS MOTEADOS (Pelodytes spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

	Na	2	4	4	3	3	3	3		Na	1	5	5	4	5	3	2
	Ne	1,600	4,000	4,000	2,667	2,667	2,667	2,667		Ne	1,000	2,571	2,882	3,379	4,667	2,279	1,508
	Ho	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500		Ho	0,000	0,667	0,714	0,714	0,857	1,000	0,429
	He	0,375	0,750	0,750	0,625	0,625	0,625	0,625		He	0,000	0,611	0,653	0,704	0,786	0,561	0,337
RM O	N	7	7	7	7	7	7	7	AYH OR	N	9	9	9	9	8	9	9
	Na	2	8	6	7	7	3	5		Na	1	8	7	6	4	4	4
	Ne	1,324	5,765	4,455	4,900	3,920	2,333	3,920		Ne	1,000	6,480	4,263	4,050	3,282	2,189	1,604
	Ho	0,000	1,000	1,000	1,000	0,571	0,857	0,857		Ho	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,778	0,444
	He	0,245	0,827	0,776	0,796	0,745	0,571	0,745		He	0,000	0,846	0,765	0,753	0,695	0,543	0,377
AEL	N	8	8	8	8	8	8	8	RUI	N	7	7	7	7	7	7	7
	Na	2	7	8	9	7	5	5		Na	1	7	7	2	5	3	5
	Ne	1,753	4,000	5,565	5,120	3,368	4,129	4,267		Ne	1,000	4,900	4,261	1,960	3,379	2,513	4,083
	Ho	0,375	0,875	1,000	1,000	0,750	0,875	0,750		Ho	0,000	1,000	1,000	0,857	1,000	0,429	0,857
	He	0,430	0,750	0,820	0,805	0,703	0,758	0,766		He	0,000	0,796	0,765	0,490	0,704	0,602	0,755
OUR	N	22	22	22	22	22	22	22	OM O	N	3	2	3	3	3	3	3
	Na	3	13	6	7	10	7	8		Na	1	4	5	3	3	3	3
	Ne	1,603	8,067	4,119	2,310	5,796	3,304	4,400		Ne	1,000	4,000	4,500	2,000	2,571	2,000	2,571
	Ho	0,364	0,909	0,818	0,273	0,864	0,909	0,955		Ho	0,000	1,000	1,000	0,667	0,333	0,667	0,333
	He	0,376	0,876	0,757	0,567	0,827	0,697	0,773		He	0,000	0,750	0,778	0,500	0,611	0,500	0,611
CAV	N	16	16	16	16	16	16	16	LEZ a	N	7	7	7	7	7	7	7
	Na	3	16	10	9	10	7	11		Na	1	9	6	4	6	4	5
	Ne	2,381	11,636	6,827	6,024	4,613	4,197	6,649		Ne	1,000	7,538	3,769	2,649	3,769	2,800	3,500
	Ho	0,750	1,000	0,688	0,938	0,563	0,813	0,938		Ho	0,000	0,714	0,571	0,714	0,857	0,857	0,714
	He	0,580	0,914	0,854	0,834	0,783	0,762	0,850		He	0,000	0,867	0,735	0,622	0,735	0,643	0,714
ARU	N	7	7	7	7	7	7	7	LEZ b	N	7	7	7	7	7	7	7
	Na	2	10	8	5	8	5	6		Na	1	3	3	1	4	2	2
	Ne	2,000	8,167	7,000	4,455	6,125	4,083	4,083		Ne	1,000	2,800	2,970	1,000	3,267	1,960	1,690
	Ho	0,714	1,000	0,857	1,000	0,714	0,714	0,571		Ho	0,000	1,000	0,857	0,000	1,000	0,571	0,571
	He	0,500	0,878	0,857	0,776	0,837	0,755	0,755		He	0,000	0,643	0,663	0,000	0,694	0,490	0,408
SED	N	2	1	2	2	2	2	2	HIG	N	4	4	4	4	4	3	4
	Na	2	2	4	3	3	3	4		Na	2	5	5	6	3	2	4
	Ne	2,000	2,000	4,000	2,667	2,667	2,667	4,000		Ne	1,600	4,571	4,571	5,333	2,133	1,385	3,556
	Ho	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,500	1,000		Ho	0,000	0,750	0,750	1,000	0,250	0,333	0,250
	He	0,500	0,500	0,750	0,625	0,625	0,625	0,750		He	0,375	0,781	0,781	0,813	0,531	0,278	0,719
GLB	N	7	7	7	7	7	7	7	SMA	N	14	13	15	15	14	15	15
	Na	2	7	5	6	5	4	3		Na	1	15	17	9	8	6	10
	Ne	1,508	4,900	1,885	5,444	3,920	3,161	2,513		Ne	1,000	12,519	14,516	4,545	4,723	3,082	3,846
	Ho	0,429	1,000	0,571	0,857	0,714	0,857	0,857		Ho	0,000	1,000	1,000	0,800	0,929	0,800	0,733
	He	0,337	0,796	0,469	0,816	0,745	0,684	0,602		He	0,000	0,920	0,931	0,780	0,788	0,676	0,740
NSE	N	7	6	7	7	7	7	7	CAD	N	5	5	5	5	5	5	5
	Na	1	7	5	6	4	4	5		Na	1	8	6	6	3	3	5
	Ne	1,000	5,538	2,227	4,455	2,970	2,800	4,261		Ne	1,000	7,143	5,000	5,556	2,381	2,778	2,500
	Ho	0,000	0,833	0,571	1,000	0,429	0,571	0,857		Ho	0,000	1,000	1,000	1,000	0,800	0,800	0,600
	He	0,000	0,819	0,551	0,776	0,663	0,643	0,765		He	0,000	0,860	0,800	0,820	0,580	0,640	0,600
CQU	N	7	7	7	7	7	5	7	CAL	N	9	9	9	9	9	9	9
	Na	2	11	7	8	6	6	7		Na	1	6	6	4	4	1	3
	Ne	1,324	9,800	5,765	6,533	5,158	5,000	5,765		Ne	1,000	3,115	5,063	2,051	3,306	1,000	1,588
	Ho	0,286	1,000	1,000	1,000	0,714	0,600	1,000		Ho	0,000	0,889	1,000	0,444	0,778	0,000	0,222
	He	0,245	0,898	0,827	0,847	0,806	0,800	0,827		He	0,000	0,679	0,802	0,512	0,698	0,000	0,370
ATA	N	4	4	4	4	4	1	4	MES	N	9	9	7	9	9	7	9
	Na	2	6	4	5	6	2	5		Na	1	8	9	3	5	6	3
	Ne	1,882	5,333	3,556	4,000	4,571	2,000	4,571		Ne	1,000	5,063	7,538	1,409	3,857	3,769	1,573
	Ho	0,750	1,000	0,500	0,750	0,750	1,000	0,750		Ho	0,000	0,667	0,857	0,333	0,778	0,714	0,222
	He	0,469	0,813	0,719	0,750	0,781	0,500	0,781		He	0,000	0,802	0,867	0,290	0,741	0,735	0,364

ANÁLISIS GENÉTICO DE DOS ZONAS DE CONTACTO SECUNDARIO EN EL SUR DE LA PENÍNSULA

TRE	N	3	4	4	3	4	4	4	CAB	N	2	2	2	2	2	2	2
	Na	3	8	4	5	6	3	4		Na	1	3	2	3	3	1	1
	Ne	2,000	8,000	2,909	4,500	5,333	2,462	2,909		Ne	1,000	2,667	2,000	2,667	2,667	1,000	1,000
	Ho	0,667	1,000	0,750	1,000	1,000	0,750	0,750		Ho	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	He	0,500	0,875	0,656	0,778	0,813	0,594	0,656		He	0,000	0,625	0,500	0,625	0,625	0,000	0,000
JER	N	4	4	4	4	4	4	4	TIR	N	7	7	4	7	7	5	7
	Na	2	7	7	6	5	5	6		Na	1	6	5	3	3	2	4
	Ne	1,882	6,400	6,400	5,333	4,000	4,571	5,333		Ne	1,000	3,920	4,571	1,815	2,000	1,724	1,581
	Ho	0,250	0,750	1,000	1,000	0,750	0,750	1,000		Ho	0,000	0,714	0,750	0,571	0,714	0,200	0,429
	He	0,469	0,844	0,844	0,813	0,750	0,781	0,813		He	0,000	0,745	0,781	0,449	0,500	0,420	0,367
FAC	N	3	3	3	3	3	2	3	DAI	N	5	5	4	5	5	5	5
	Na	1	6	3	5	4	4	5		Na	1	3	7	3	3	3	5
	Ne	1,000	6,000	2,571	4,500	3,000	4,000	4,500		Ne	1,000	2,632	6,400	2,632	2,174	2,778	3,846
	Ho	0,000	1,000	0,667	1,000	1,000	1,000	0,667		Ho	0,000	1,000	1,000	1,000	0,600	0,800	0,800
	He	0,000	0,833	0,611	0,778	0,667	0,750	0,778		He	0,000	0,620	0,844	0,620	0,540	0,640	0,740
GRZ	N	11	10	11	11	10	10	10	PP	N	6	6	6	6	6	6	6
	Na	2	8	7	8	2	5	4		Na	1	11	8	5	6	4	4
	Ne	1,766	5,556	3,361	6,205	1,471	3,125	2,469		Ne	1,000	10,286	6,545	3,789	5,143	3,273	2,667
	Ho	0,636	1,000	0,727	0,909	0,000	0,900	0,500		Ho	0,000	1,000	1,000	0,500	0,833	0,833	0,500
	He	0,434	0,820	0,702	0,839	0,320	0,680	0,595		He	0,000	0,903	0,847	0,736	0,806	0,694	0,625

Tablas 5. Resultados del test AMOVA con marcadores nucleares (7 microsatélites) agrupados por sus correspondientes clados mitocondriales según el análisis de RFLP del gen mt-CYB en *Pelodytes* spp. Están representados las localidades de la zona de contacto en Portugal (A) y España (B)

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance of components		Percentage of variation
Among groups	1	160.428.612	40.440.183	Va	24.82
Among populations within groups	34	252.426.398	28.744.284	Vb	17.64
Within populations	798	748.213.325	93.761.068	Vc	57.54
Total	833	1.161.068.335	162.945.535		

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance of components		Percentage of variation
Among groups	1	753.596.409	203.028.621	Va	42.95
Among populations within groups	32	437.256.636	53.675.059	Vb	11.36
Within populations	756	1.632.917.899	215.994.431	Vc	45.69
Total	789	2.823.770.944	472.698.111		

Tabla 6. Valores Fst por pares de localidades para el conjunto de microsatélites (7) y estima del promedio de divergencia evolutiva (p-distances) por pares de secuencias en los transecto de la zona de contacto entre *P. ibericus* y *P. atlanticus* (figura 7) y *P. ibericus* y *P. hespericus* (figura 8). En la matriz, bajo la diagonal se muestra los valores Fst resultado del análisis por pares para las 15 localidades incluidas en el transecto y sobre la diagonal, la media de diferencias por sitio (excluyendo huecos) para el conjunto de pares total. El análisis incluye 87 secuencias para la zona portuguesa (A) y 83 para la española (B).

	TEL	BRR	BMP	CVL	VMF	SOL	SLU	CBS	XAU	OLO	CID	GRA	RMT	GLB	NSE
TEL	-	0,003	0,005	0,002	0,003	0,017	0,002	0,011	0,016	0,031	0,045	0,023	0,044	0,044	0,044
BRR	0,140	-	0,005	0,001	0,003	0,018	0,002	0,012	0,017	0,031	0,045	0,024	0,044	0,045	0,044
BMP	0,058	0,153	-	0,004	0,003	0,017	0,004	0,012	0,018	0,033	0,046	0,025	0,046	0,046	0,046
CVL	0,177	0,292	0,177	-	0,002	0,017	0,001	0,011	0,016	0,031	0,044	0,023	0,044	0,044	0,044
VMF	0,078	0,177	0,095	0,220	-	0,016	0,002	0,011	0,017	0,031	0,045	0,023	0,044	0,044	0,044
SOL	0,096	0,220	0,148	0,221	0,183		0,016	0,019	0,021	0,026	0,030	0,023	0,029	0,030	0,029
SLU	0,067	0,166	0,048	0,178	0,102	0,093	-	0,010	0,015	0,030	0,044	0,022	0,043	0,044	0,043
CBS	0,045	0,144	0,049	0,144	0,071	0,083	0,038	-	0,019	0,028	0,036	0,023	0,035	0,036	0,035
XAU	0,112	0,185	0,099	0,226	0,142	0,162	0,069	0,072	-	0,026	0,030	0,023	0,030	0,030	0,029
OLO	0,071	0,172	0,070	0,165	0,086	0,092	0,027	0,025	0,082	-	0,015	0,023	0,015	0,017	0,016
CID	0,116	0,168	0,111	0,216	0,168	0,190	0,096	0,096	0,067	0,120	-	0,023	0,001	0,003	0,002
GRA	0,069	0,162	0,057	0,185	0,103	0,114	0,191	0,032	0,075	0,131	0,056	-	0,023	0,023	0,022
RMT	0,067	0,166	0,129	0,261	0,135	0,156	0,116	0,053	0,120	0,074	0,118	0,085	-	0,003	0,001
GLB	0,140	0,250	0,153	0,304	0,203	0,230	0,156	0,115	0,201	0,163	0,203	0,176	0,141	-	0,001
NSE	0,169	0,248	0,190	0,304	0,252	0,155	0,193	0,186	0,322	0,260	0,304	0,178	0,086	0,126	-

	ARQ	JAE	SAN	IZN	BEA	ALD	VRO	REO	ALC	BON	AYHOR	RUI	LEZa	LEZb	SMA
ARQ	-	0,001	0,001	0,011	0,001	0,001	0,041	0,041	0,041	0,042	0,040	0,042	0,041	0,042	0,041
JAE	0,062	-	0,000	0,010	0,000	0,000	0,041	0,040	0,040	0,041	0,040	0,042	0,040	0,041	0,040
SAN	0,066	0,079	-	0,011	0,000	0,000	0,041	0,040	0,040	0,041	0,040	0,042	0,040	0,041	0,040
IZN	0,154	0,188	0,177	-	0,010	0,010	0,031	0,031	0,031	0,032	0,031	0,032	0,031	0,032	0,031
BEA	0,093	0,149	0,193	0,278	-	0,000	0,041	0,040	0,040	0,041	0,040	0,042	0,040	0,041	0,040
ALD	0,065	0,081	0,077	0,158	0,198	-	0,041	0,040	0,040	0,041	0,040	0,042	0,040	0,041	0,040
VRO	0,159	0,190	0,180	0,210	0,260	0,175	-	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001
REO	0,254	0,275	0,318	0,339	0,385	0,285	0,161	-	0,000	0,001	0,001	0,002	0,000	0,001	0,000
ALC	0,194	0,205	0,221	0,262	0,308	0,219	0,061	0,157	-	0,001	0,001	0,002	0,000	0,001	0,001
BON	0,230	0,251	0,272	0,304	0,331	0,264	0,122	0,262	0,178	-	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001
AYHOR	0,229	0,242	0,261	0,286	0,349	0,254	0,091	0,206	0,079	0,169	-	0,002	0,001	0,002	0,001
RUI	0,205	0,205	0,241	0,260	0,308	0,225	0,088	0,175	0,040	0,199	0,146	-	0,002	0,002	0,002
LEZa	0,191	0,201	0,216	0,267	0,300	0,220	0,069	0,147	0,068	0,126	0,114	0,096	-	0,001	0,000
LEZb	0,320	0,307	0,345	0,353	0,404	0,341	0,160	0,310	0,233	0,229	0,246	0,271	0,115	-	0,001
SMA	0,146	0,168	0,167	0,211	0,249	0,170	0,036	0,130	0,024	0,102	0,061	0,044	0,036	0,164	-

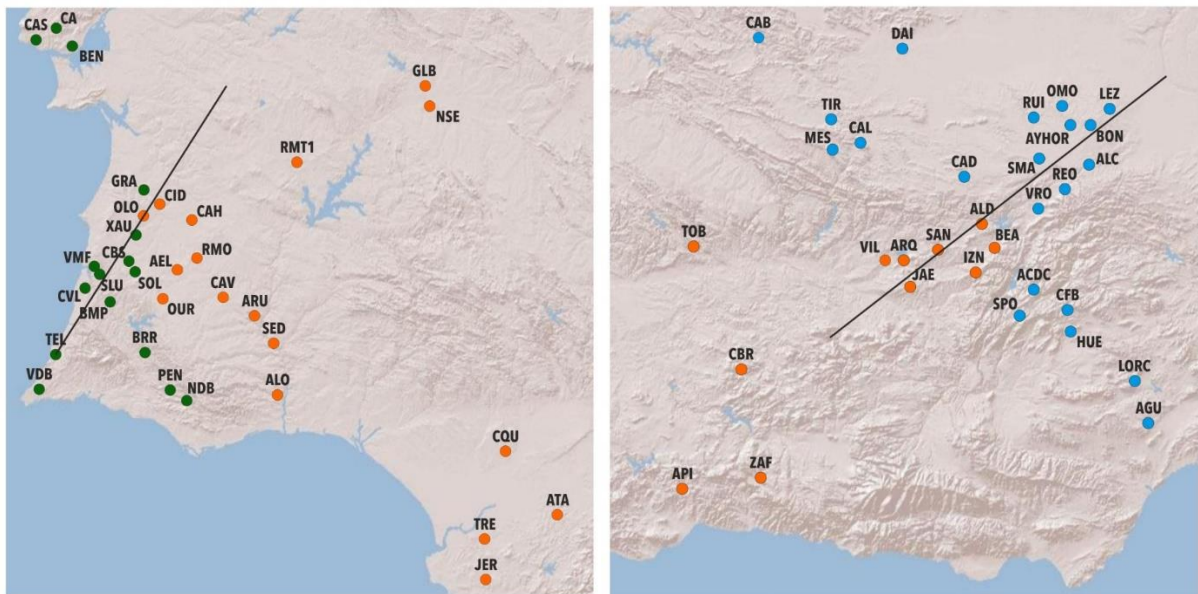


Figura 1. Mapas de distribución de las localidades muestreadas y dirección seguida por el transecto en ambas zonas de contacto secundario. A – zona de contacto secundario entre *P. ibericus* y *P. atlanticus*. B – zona de contacto secundario entre *P. ibericus* y *P. hespericus*. Los códigos de los puntos coinciden con los de las localidades y los colores con la pertenencia a cada clado mitocondrial basados en el promedio de individuos encontrados: verde- linaje A; naranja,- linaje B y azul- linaje C.

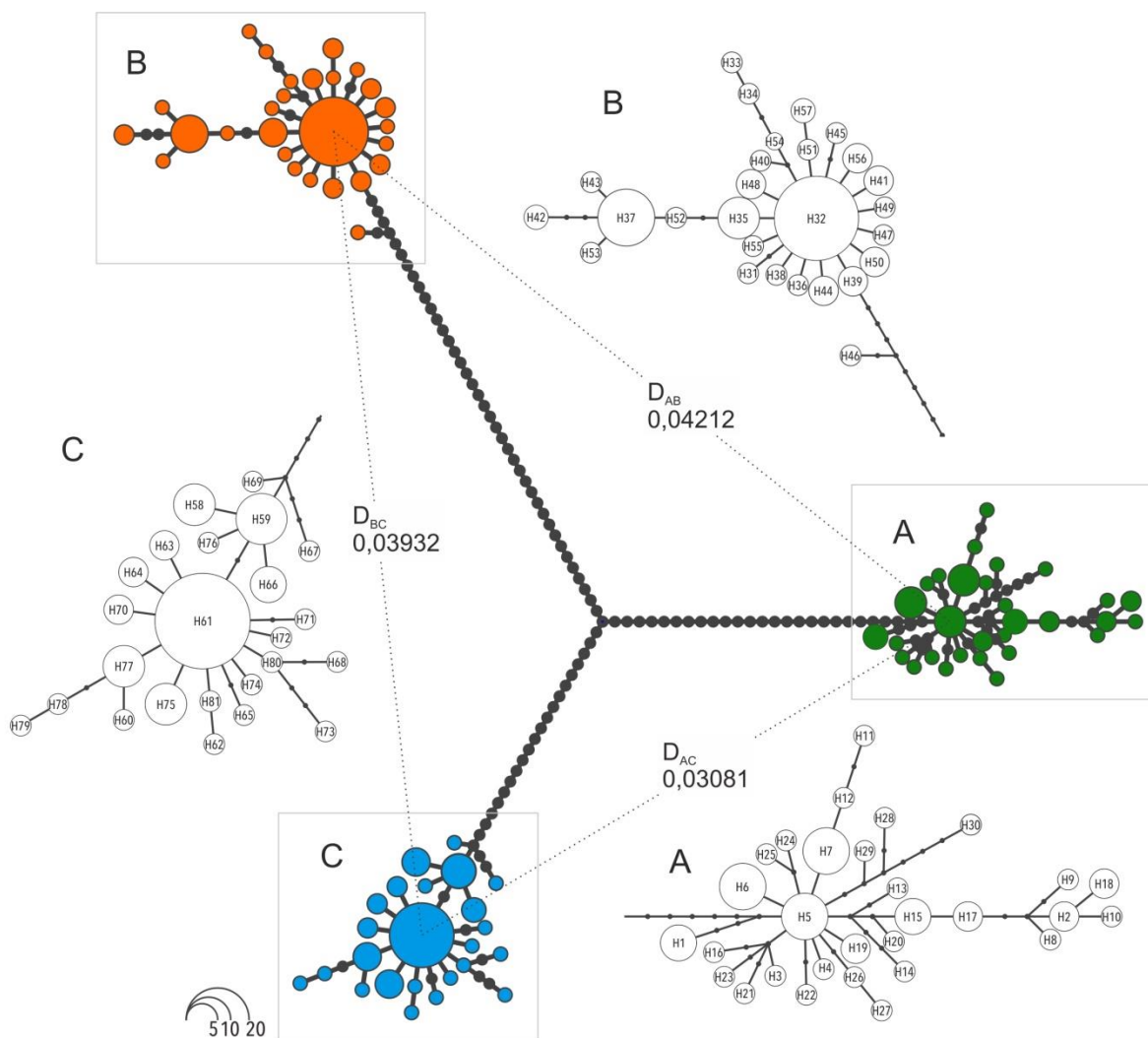
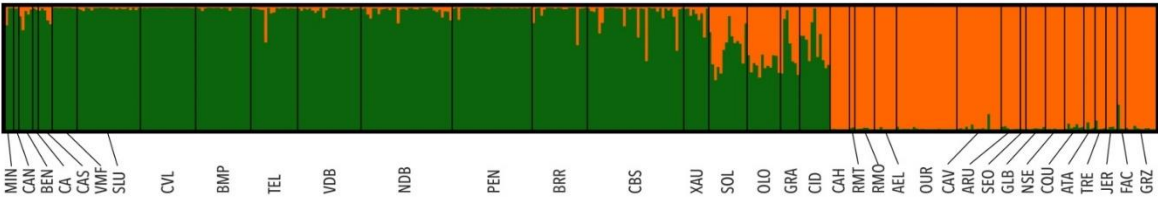
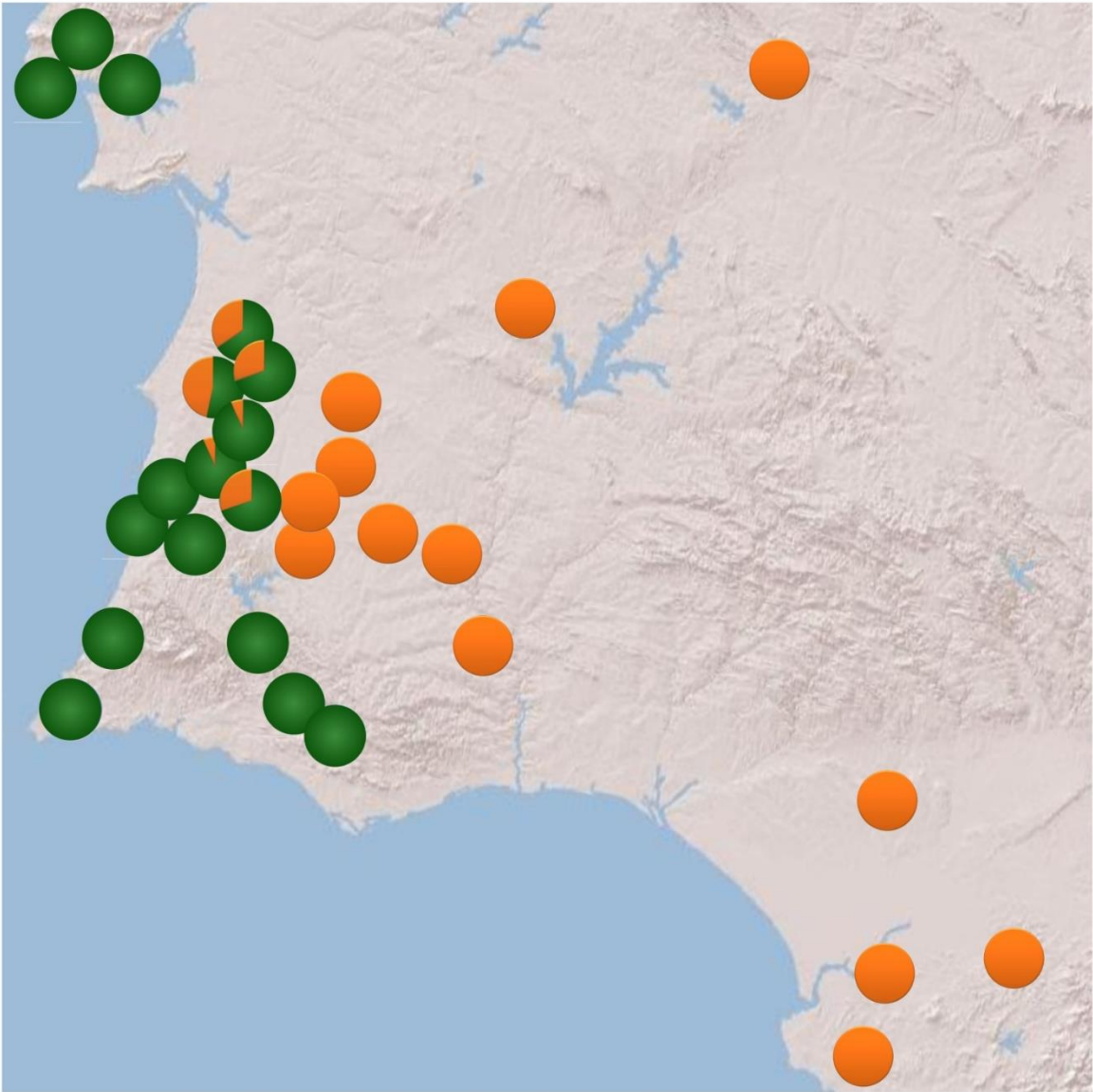


Figura 2. Red de haplotipos mitocondriales (mt-CYB y mt-ND4) para el análisis de máxima verosimilitud de 180 secuencias pertenecientes a las localidades muestreadas. Cada círculo representa un haplotipo de distinto color según el clado mitocondrial, siguiendo el mismo patrón que en las figuras 1 y 2, marcado con la letra H y el número correspondiente. El tamaño de los círculos está a escala (parte inferior del gráfico) y es proporcional a su frecuencia relativa. Se indican las distancias (D_a) entre cada linaje.

HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS (Pelodytes spp.) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA



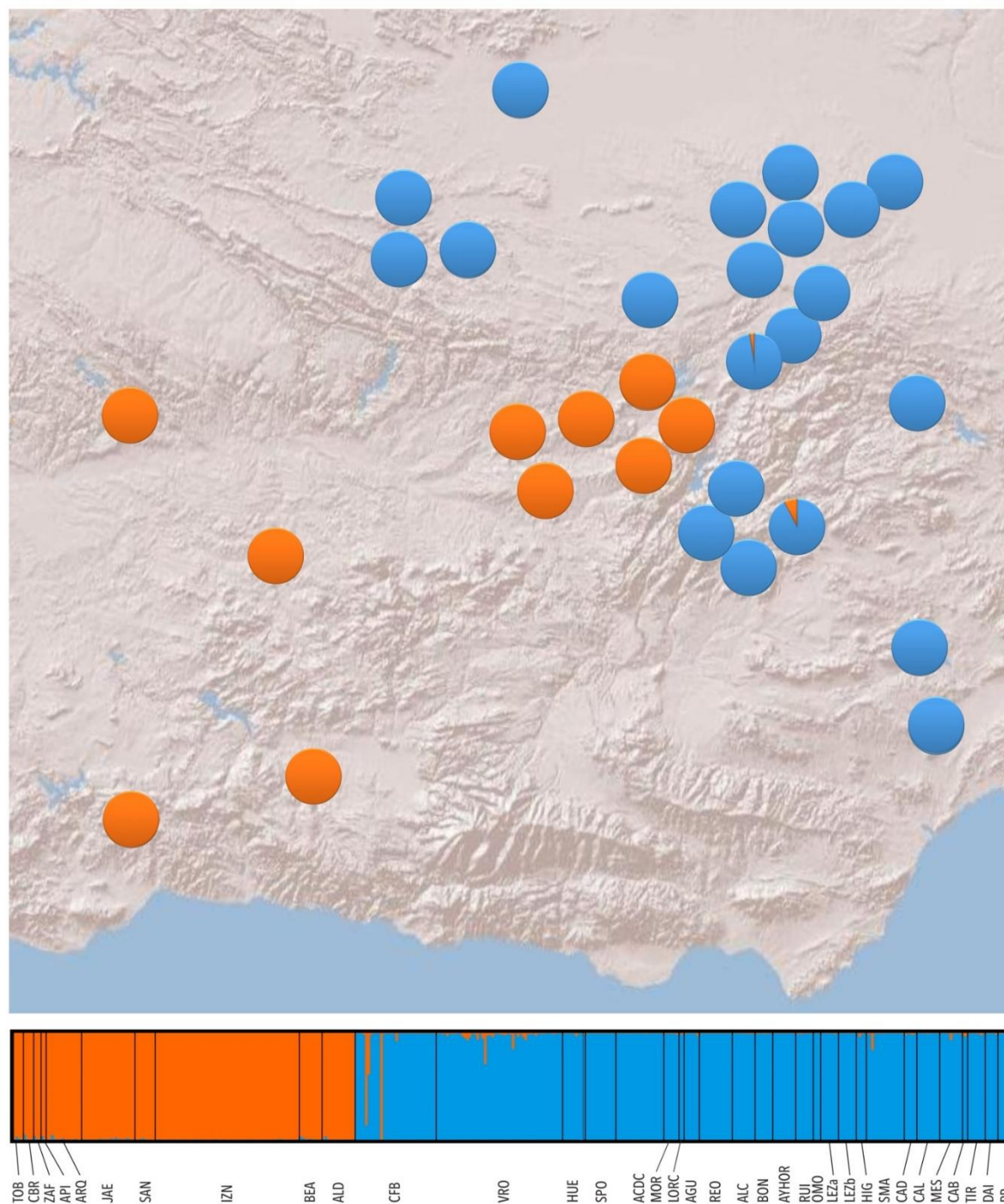


Figura 3. Mapas mostrando la proporción de pertenencia a cada clado inferido del análisis bayesiano. El color del círculo representa la proporción de pertenencia a cada linaje por localidad para el conjunto total de microsatélites. En la parte inferior los resultados del análisis bayesiano de agrupación de STRUCTURE para el K más probable según el método de Evanno ($k=2$). Cada individuo está representado en una línea vertical coloreada que representa una estimación del coeficiente de correspondencia a uno u otro grupo. Las líneas negras separan individuos de localidades diferentes. A – zona de contacto secundario entre *P. ibericus* y *P. atlanticus*. B – zona de contacto secundario entre *P. ibericus* y *P. hespericus*.

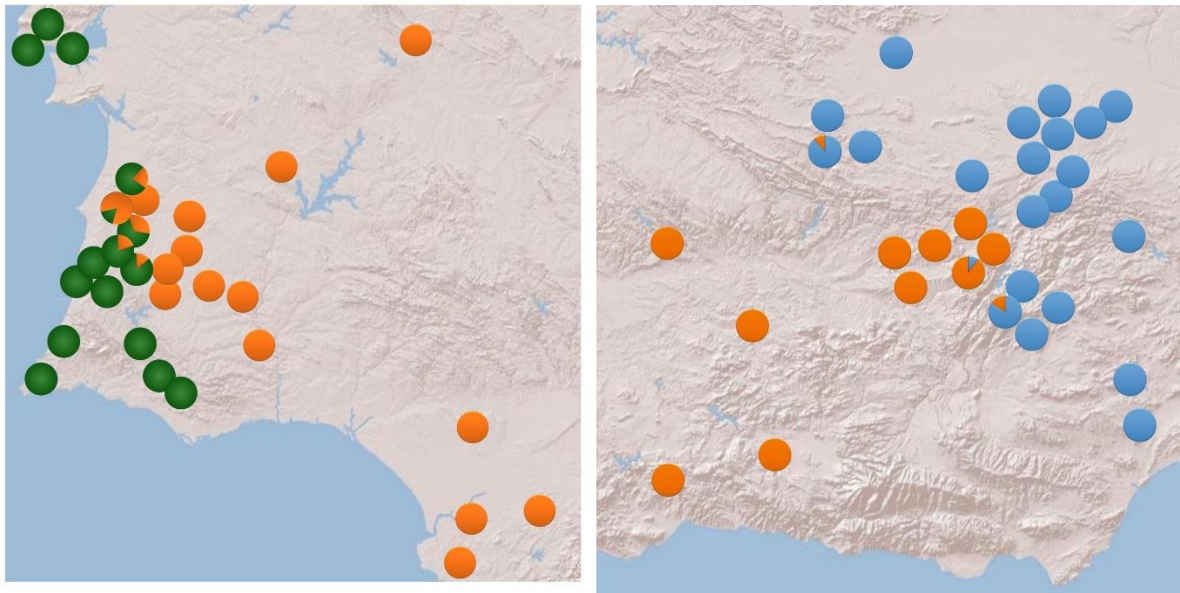


Figura 4. Proporción de pertenencia a cada clado mitocondrial para las mismas localidades en base a los resultados del análisis de RFLP del fragmento de mt-CYB en ambas zonas de contacto (A – zona de contacto secundario entre *P. ibericus* y *P. atlanticus*. B – zona de contacto secundario entre *P. ibericus* y *P. hespericus*).

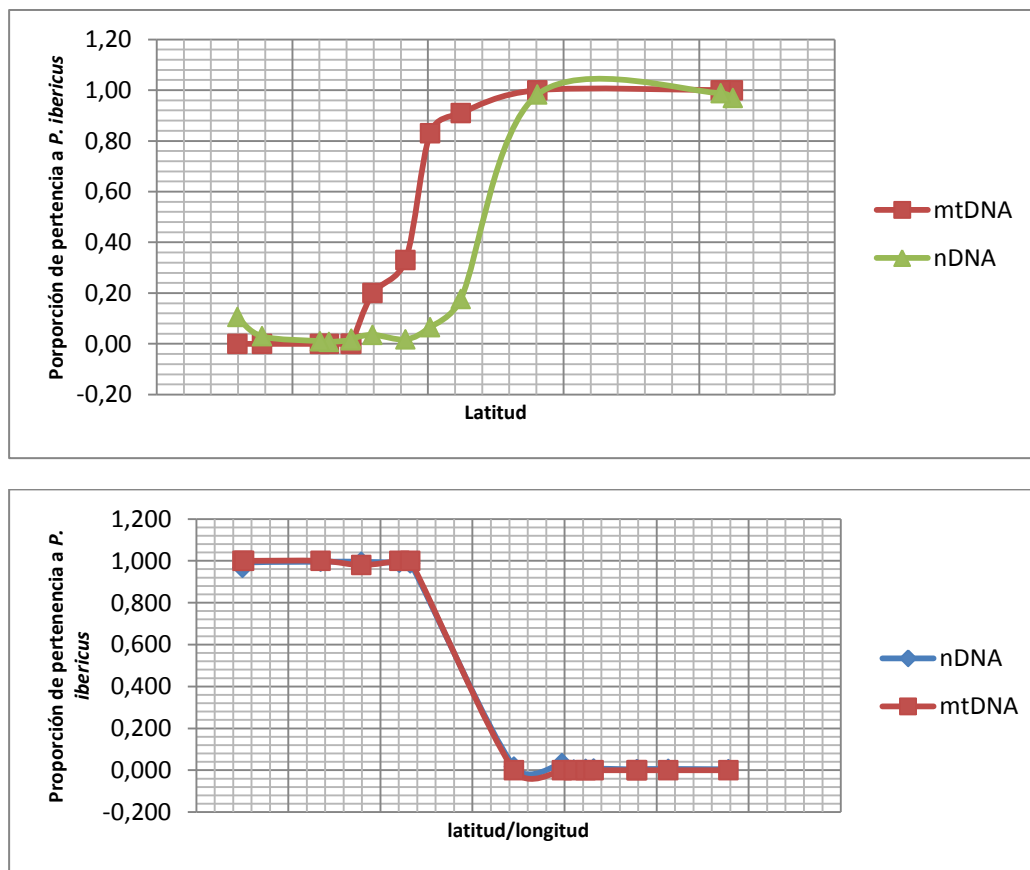


Figura 5. Representación de las clinas nucleares y mitocondriales para el conjunto de microsatélites (7)- con la proporción de pertenencia inferida del análisis bayesiano- y el porcentaje de individuos pertenecientes a cada linaje mitocondrial -resultado del análisis de RFLP- en ambas zonas de contacto. Las localidades están dispuestas en orden ascendente de latitud en la zona de contacto portuguesa, figura 5A (*P. ibericus* / *P. atlanticus*) o respecto al eje trazado por la latitud/longitud en la zona de contacto española, figura 5B (*P. ibericus* / *P. hespericus*).

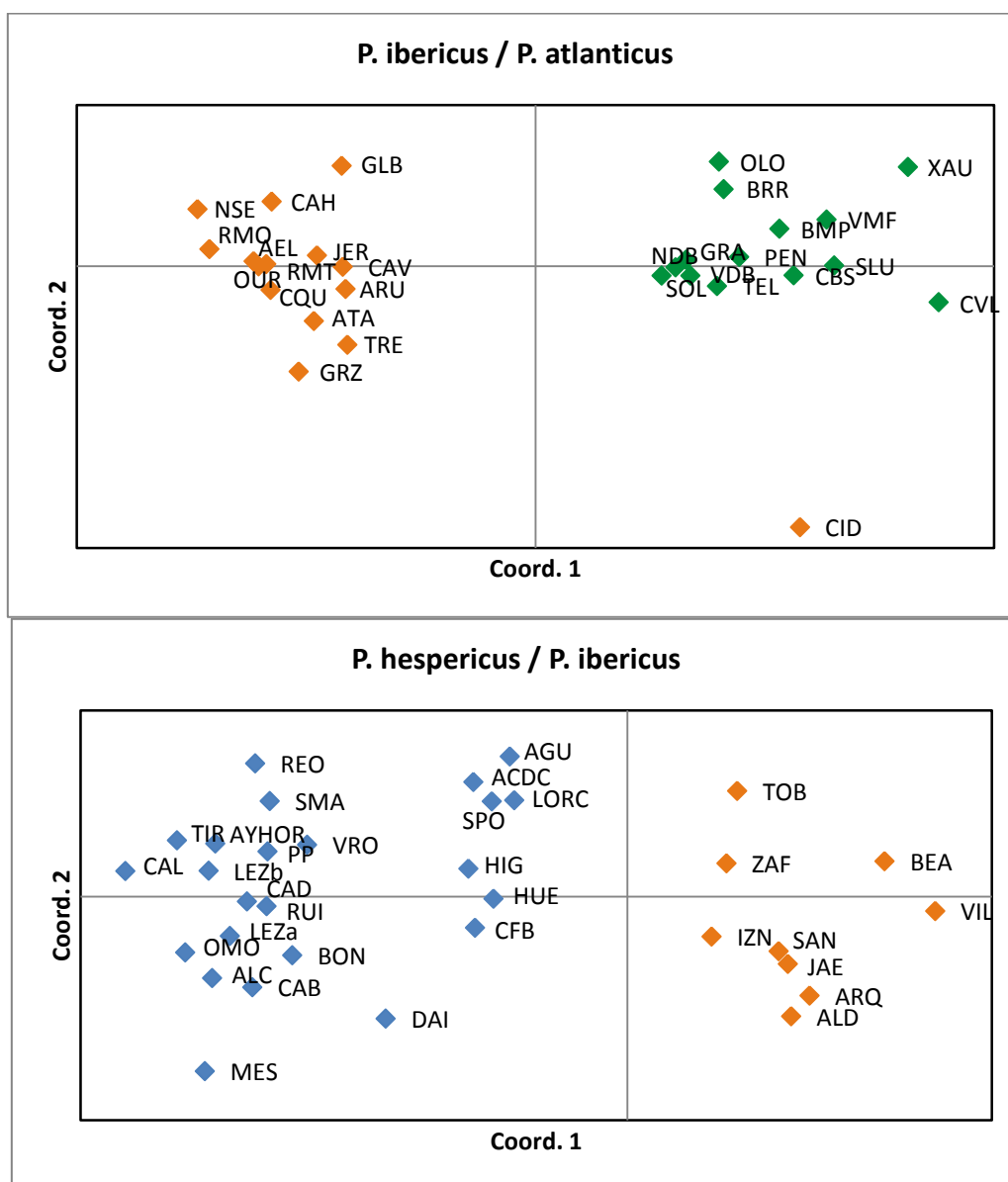


Figura 6. Análisis Principal de Coordenadas (PCoA) basado en la variación entre pares de localidades (Fst). Patrón de variabilidad en base a los valores de Fst con significación en los ejes de coordenadas para discriminar localidades de ambas zonas de contacto. A – zona de contacto secundario entre *P. ibericus* y *P. atlanticus*. B – zona de contacto secundario entre *P. ibericus* y *P. hespericus*.

DISCUSIÓN GENERAL

La mayoría de los procesos evolutivos están compuestos por largos períodos de estabilidad, interrumpidos por episodios cortos y poco frecuentes donde ocurre la bifurcación o cladogenesis (Eldredge y Gould, 1972). Cualquier proceso de especiación tiene un grado inherente de complejidad, ya que la persona que investiga debe inferir una secuencia general de eventos a partir de un número de observaciones reducido, realizado entre las poblaciones que encuentra en el momento presente. Cuando detectamos características distintivas en estas poblaciones, el proceso de diferenciación se ha dado ya en el pasado, con lo que constatamos el resultado del mismo. Los procesos de especiación no sólo han llegado a la conclusión de su desarrollo, ya sea por aislamiento genético, geográfico y/o ecológico, sino que han podido sufrir modificaciones o reversiones, que nublan la comprensión de las causas principales de su origen y desarrollo.

Los antecedentes de esta tesis se remontan al estudio publicado por Paillete et. al (1992) en el que se describían, mediante el análisis comparativo, las características del canto de apareamiento en tres localidades del género *Pelodytes*: una en el sur de la península Ibérica (Algarve, Portugal) y otras dos distribuidas más al norte, en la región sureste de Francia (Camargue) y norte Italia (Liguria). No es la primera vez que se pone en relieve la singularidad y variabilidad de un carácter comportamental relacionado con la reproducción, el canto de apareamiento en poblaciones de *Pelodytes* (Hotz, 1971; Paillete, 1971; van den Elzen, 1976). Sin embargo, si es el primer estudio que pone de manifiesto tales diferencias en un marco geográfico, atribuidas a variedades dialectales dentro del rango de distribución de la especie. Este argumento sirve de base al estudio publicado años más tarde por Sánchez-Herráiz et al. (2000) en el cual se detalla, a partir del análisis de un conjunto de caracteres morfológicos, morfométricos, osteológicos, genéticos y bioacústicos, la diversidad biológica presente en un número amplio de localidades de la Península Ibérica. Los autores destacan la marcada diferenciación de las poblaciones ibéricas y se propone la descripción de una nueva especie, *Pelodytes ibericus*, a la que estarían adscritas todas las localidades analizadas y situadas al suroeste de la península, desde España a Portugal, sugiriéndose la presencia únicamente de esta especie en ese último país. Por otra parte, los autores también destacan las diferencias, moleculares (enzimática y genética) y morfológicas, de una localidad procedente del noreste peninsular (Barcelona) y proponen la existencia de un nivel subespecífico en Cataluña (*Pelodytes punctatus punctatus*). Paralelamente, Pargana (1998) en el trabajo de tesina exclusivamente centrado en localidades de Portugal, realiza un estudio de la variación genética y las características espectrales y temporales del canto de apareamiento, encontrando diferencias notables entre localidades al sureste atribuidas consecuentemente a *P. ibericus*. Estudios posteriores basados en secuencias de ADN mitocondrial

reportaron la existencia de una alta variabilidad genética y la subdivisión de las poblaciones del género en la Península Ibérica. La atribución de las poblaciones portuguesas a *P. punctatus* se pone en entredicho en diversas publicaciones (Tejedo *et al.*, 2003; Veith *et al.* 2006; Crespo *et al.*, 2010) y estudios posteriores que consideran las diferencias genéticas una señal de la existencia de un linaje críptico en el suroeste de Portugal distinto de *P. ibericus* (van de Vliet *et al.*, 2012).

Bajo este marco de antecedentes históricos y ante la falta de un estudio integrador, la Península Ibérica ya contaba, hasta el momento de la presente investigación, con los mayores índices de biodiversidad conocidos para la familia Pelodytidae, dentro de la amplitud del rango geográfico que en la actualidad ocupa. No obstante, a partir de nuestras propias observaciones, los elevados niveles de variabilidad apuntados estarían respondiendo a unos patrones filogeográficos definidos y comunes con otras especies de anfibios y reptiles, como veremos más adelante.

Nuestros análisis sobre la divergencia genética dentro del género *Pelodytes* demuestran que, en la línea de los resultados anteriores y corroborando la hipótesis de partida de esta tesis, la diversidad en el interior del grupo se encuentra subestimada.

El patrón de variación de las secuencias nucleares y mitocondriales obtenidas a lo largo del rango de distribución de las especies occidentales, revelan la existencia de un complejo críptico de, al menos, cuatro linajes evolutivos independientes en Europa occidental (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015). En la línea propuesta por las observaciones de Gómez y Lunt (2007) o Abellán y Svenning (2014), la estrecha correlación entre esta variación genética y la geografía sugieren un escenario de permanencia a largo plazo en el interior de múltiples subrefugios cuaternarios en la Península Ibérica y la existencia de distintas unidades filogeográficas originadas en ellos (Taberlet *et al.* 1998; Hewit, 2000, 2004). Además, y como consecuencia de ello, se describe la presencia de dos nuevas especies candidatas, *P. atlanticus* y *P. hespericus* que formarían parte de sendos linajes evolutivos diferenciados de *P. ibericus* y *P. punctatus* respectivamente en distintos momentos evolutivos.

El enfoque multilocus mostrado en el capítulo primero basado en un modelo coalescente, apoyado por la validación molecular (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015), corrobora la separación del grupo en cuatro subtipos distintos y revela haplotipos agrupados en linajes geográficos bien diferenciados, denominados en este estudio clados A, B, C y D: *P. ibericus* Sánchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom y Sanchíz, 2000 (clado B) se distribuye principalmente en el sur de Iberia, con especies presentes en el sureste de Portugal y suroeste de España; *P. punctatus* (clado D) incluye todas las poblaciones al norte de los Pirineos, incluida la localidad tipo de *P. punctatus* ("aux alrededores de Beauvais", Departamento Oise, al norte de Francia: Daudin, 1802) y estaría formada por dos sublinajes, uno de los cuales se produce desde Cataluña hasta el norte de Francia y un segundo restringido al sur de Francia y norte de Italia; el clado A (descrito en esta tesis como *P. atlanticus*) en localidades dispersas a lo largo de la costa atlántica de Portugal y, por último, el clado C (descrito en esta tesis como *P.*

hespericus) en el centro-sureste de la Península Ibérica, intercalado entre los rangos de distribución de *P. ibericus* y *P. punctatus*.

Como previamente habían descrito estudios anteriores (García-París *et al.* 2003; Sánchez-Herráiz, 2004; Veith *et al.* 2006), la hipótesis filogenética de monofilia en el único género reconocido dentro de la familia, propone que las especies pertenecientes al linaje occidental compartirían un antepasado común y separado del linaje oriental a partir del límite entre el final del Oligoceno e inicio del Mioceno. Nuestras estimas dan un rango más o menos amplio para la separación entre el linaje oriental y occidental, con un valor medio de hace aproximadamente unos 22 millones de años. Para situarnos temporalmente, conviene saber que la conexión más reciente de tierra continua a través de Europa central entre estas dos regiones (desde el suroeste de Europa hasta Anatolia) sería al final del Oligoceno, hace unos 23 millones de años. Durante el Mioceno temprano, hace unos 20 millones de años, ambas se separaron, al mismo tiempo que se inician una serie de cambios climáticos (entre 22 y 17 millones de años) junto con el auge de los sistemas montañosos de Europa central (Vennemann y Hegner, 1998). La formación de una vía marítima entre los mares *tetis* y *paratetis*, el aumento de los Alpes y un cambio en el clima causante de perturbaciones en el hábitat favorable de las especies, pudieron estar relacionados con el origen de estos eventos vicariantes. La separación recuerda la distribución de otras especies de anfibios y reptiles, P. ej. en el interior de la familia Pelobatidae (*Pelobates cultripes* vs. *Pelobates syriacus*) (García-París *et al.* 2003), o Salamandridae (*Mertensiella caucásica* vs. *Chiglossa lusitanica*) (Weisrock *et al.* 2001), e incluso en la distribución dentro de Lacertidae (*Timon lepidus* vs. *Timon princeps*) aunque con estimas de tiempo ligeramente más recientes (Ahmadzadeh *et al.* 2012). En cualquier caso, la familia Pelodytidae parece haber vivido en Europa al menos durante el Mioceno (Roček, 2005) con formas que podrían considerarse *Pelodytes* o géneros muy próximos, aunque no existen registros que aporten datos cronológicos sobre la diferenciación hipotética entre ambos linajes. *P. arevacus*, taxón extinto y descrito como antepasado perteneciente al clado del linaje occidental, habitaría regiones en el interior de la Península Ibérica desde el Mioceno medio (Martín y Sanchíz, 2015). El único taxón relicto del linaje oriental sería *P. caucásicus*, endémico de las regiones caucásicas y transcaucásicas, de características morfológicas consideradas muy primitivas (Sanchíz *et al.* 2002).

Nuestros estudios filogenéticos iniciales, partiendo de un análisis multilocus basados en dos genes mitocondriales y dos nucleares, apuntaban a un posible origen Plio-Pleistocénico del clado occidental, con una edad estimada máxima de divergencia de hace alrededor de 3,6 millones de años que se corresponden plenamente con los resultados de los análisis previos de Sánchez-Herráiz (2004) basados en aloenzimas. No obstante, la separación estimada para marcadores mitocondriales en ese mismo estudio y otros similares (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000; García-París *et al.* 2003; Veith *et al.* 2006) pone de relieve el problema de las estimas basadas únicamente en marcadores mitocondriales,

cuando se utilizan distintas tasas de mutación para la calibración del reloj molecular, una cuestión que no es nueva en la resolución de las separaciones filogenéticas especialmente de anfibios primitivos.

Por otro lado, las estimaciones de divergencia anteriores, basadas únicamente en ADN mitocondrial (Sánchez-Herráiz *et al.*, 2000; Sanchíz *et al.*, 2002; García-París *et al.*, 2003) recuperan *P. ibericus* como la especie más antigua después de *P. caucasicus*, con una edad promedio de entre 3.3 a 3.7 millones de años. Teniendo en cuenta la existencia de una tasa constante de evolución en aloenzimas, Sánchez-Herráiz (2004) estimó que el MRCA (antepasado común más reciente) para las poblaciones del interior de Cataluña (*P. punctatus*), claramente divergentes del resto de las poblaciones ibéricas en los estudios osteológicos y genéticos previos (Sánchez-Herráiz *et al.* 2000; García-París *et al.*, 2003), correspondería a unos de 2 millones de años, mientras que, según las estimaciones basadas en ADN mitocondrial (16S y mt-CYB) la separación de *P. punctatus* tendría lugar mucho antes en el tiempo, en la base de la radiación occidental.

En la presente tesis, la exploración de los datos de ADNmt, unida al análisis de diferentes tipos de genealogías nucleares y marcadores de evolución rápida (microsatélites) puso de manifiesto cuatro linajes evolutivos principales bien soportados en Europa Occidental, correspondientes a subdivisiones geográficas delimitadas y que muestran un marcado contraste en sus historias demográficas.

La presencia en el registro fósil de Peloditidos en España, Italia, Francia y Alemania (Martín y Sanchíz, 2015), sugiere que los antepasados de estas especies vivieron en áreas de Europa en un periodo extenso de tiempo que abarca el Mioceno hasta el Pleistoceno. Las especies al interior del clado, habrían sufrido un proceso de diferenciación, probablemente debido a los ciclos de contracción y expansión post-glacial, como atestiguan restos fósiles hallados en Europa Occidental y datados en el Pleistoceno Medio y Superior (Holman, 1998; Roček y Rage, 2000; Delfino, 2002; Blain y Bailón, 2003; Delfino, 2004). La edad del primer resto fósil adscrito claramente al clado de los *Pelodytes* recientes, está reportado en el yacimiento de Sète, Cap de Lazaret, (Hérault) al sureste de Francia (Blain, 2009). Usando esta calibración fósil, nuestras propias estimaciones de divergencia dentro del linaje occidental de *Pelodytes*, datan el origen de la división entre el Plioceno o Pleistoceno, en torno a 3,8 millones de años de edad, recuperando edades de separación para todos los taxones ibéricos entre hace 2.3 a 3.8 millones de años. En base a nuestros análisis, el árbol de especies filogenético para dos marcadores mitocondriales y seis nucleares, incluyendo genes nucleares con tasa de evolución menor, tendría una tasa de ADNmt estimado resultante (0.0056 / site / Mya). Este resultado estaría de acuerdo con las lentas tasas de sustitución mitocondrial dentro de los arqueobatracios, con un linaje reciente dentro del clado separado hace alrededor de 2 millones de años que corrobora el registro fósil de *Pelodytes punctatus sensu lato* y que estaría en el origen de las especies *P. hespericus* y *P. punctatus sensu stricto* distribuidas en la actualidad en el norte de la Península Ibérica y resto de Europa

Occidental. Las evidencias disponibles hasta la fecha apuntan a la separación de los linajes al suroeste de la península, entre 3 y 4 millones de años, sugiriendo un origen pliocénico para las especies, *P. ibericus* y *P. atlanticus*, que habrían estado siempre confinadas en Iberia.

En el escenario propuesto, durante los dos episodios iniciales de glaciación del Pleistoceno, denominados Biber (2,5 millones de años) y Donau (1,8 millones de años) la migración de las especies de *Pelodytes* hacia refugios glaciales del sur, que se había iniciado mucho antes, durante el Plioceno, debió contribuir al proceso de diferenciación. El periodo glacial posterior que caracterizó la Europa atlántica (Beestoniense) y Centro-Europa (Günz) durante el cuaternario, permitió, no obstante, cierta recuperación de las comunidades en la región Mediterránea que permanecieron alejadas de los hielos. Teniendo en cuenta el proceso de diversificación dentro de la Península Ibérica y las estimas de edad obtenidas en nuestros análisis, con divergencias Plio-Pleistoceno entre los diferentes, la estabilidad al interior de estos refugios separados durante el resto de oscilaciones climáticas que vinieron sucediendo en el Cuaternario (Abellán y Svenning, 2014), habrían originado cambios en los rangos de distribución sin nuevos eventos de separación y/o diferenciación, dando como resultado las zonas de contacto observadas en la actualidad.

Nuestros resultados sugieren, por tanto, la contribución de episodios de aislamiento a largo plazo dentro de Iberia durante sucesivos ciclos glaciales. La divergencia filogeográfica se ha visto mantenida, en primer lugar, por el tiempo de aislamiento prolongado en distintos subrefugios, pero también probablemente, por la marcada filopatría y los tamaños poblacionales de la especie. A pesar de los periodos de rápida expansión durante los periodos interglaciales, se ha mantenido la estructura filogeográfica acumulada probablemente por la existencia de barreras reproductivas que han dificultado la mezcla entre las distintas unidades filogeográficas, como veremos más adelante.

Estos resultados muestran cierto paralelismo con los patrones temporales de separación descritos en otras especies filopátricas de anfibios y reptiles como *Chioglossa lusitánica* (Alexandrino *et al.* 2000, 2002), *Rana temporaria* (Veith *et al.* 2003), *Lacerta schreiberi* (Paulo *et al.* 2002) o *Lacerta lepida* (Paulo *et al.* 2008; Miraldo, 2012), con clados mitocondriales alopátricos cuyo origen se remonta al límite Plio-Pleistocénico o anterior. Por otro lado, y en contraste con este patrón, la división reciente del clado suroeste de la península, sugiere un escenario diferente que recuerda a especies de distribución atlántica con linajes mitocondriales recientes: *Alytes cisternasii* (Gonçalves *et al.* 2009), *Discoglossus galganoi* (Martínez-Solano *et al.* 2004) o dentro de cada uno de los linajes de *Lissotriton boscai* (Martínez-Solano *et al.* 2006). Estos patrones apuntarían a múltiples y recientes refugios endémicos en Iberia fruto de eventos vicariantes coincidentes en el tiempo. Hay que tener en cuenta que mientras estos eventos históricos pueden tener efectos similares en especies co-distribuidas en la península, también es muy probable que cada unidad filogeográfica responda de manera diferente a los mismos eventos de acuerdo a las características ecológicas del rango de distribución

que ocupen. El grupo de especies que se limita a la mitad atlántica de la Península Ibérica, corresponde a las áreas refugio del bosque caducifolio durante el último máximo glacial (Zagwijn 1992).

Algunos de estos taxones han sido previamente estudiados desde una perspectiva filogeográfica. Estos estudios han puesto de manifiesto la existencia de varios refugios dentro de la Península Ibérica, lo que sugiere una larga historia de la persistencia de las poblaciones a través de los ciclos geológicos. La situación en la que dos clados evolutivos diferenciados ocupan diferentes vertientes en la Península Ibérica no es nueva. La estructura filogeográfica observada en *Pelodytes*, con dos patrones de distribución, uno atlántico y otro mediterráneo, refleja cierta similitud con otras especies de anfibios y reptiles distribuidos en la península. Salvando las distancias, la distribución de *P. atlanticus* recuerda el caso de los sapos parteros (*Alytes cisternasii*) (Gonçalves *et al.*, 2009), el tritón ibérico (*Lissotriton boscai*) (Martínez-Solano *et al.*, 2006), ranita de San Antonio (*Hyla molleri*) (Stöck *et al.* 2012) y algunas subespecies del género salamandra (*Salamandra salamandra*) (Reis *et al.* 2011) o entre los reptiles la lagartija colilarga (*Psammotromus* spp.) (Fitze *et al.* 2011). De manera parecida, especies de anfibios y reptiles de la vertiente mediterránea: sapillo pintojo (*Discoglossus jeanneae*) (Fromhage *et al.* 2004), la lagartija colilarga (*Psammotromus jeanneae*) (Busack *et al.* 2006), el eslizón ibérico (*Chalcides bedriagai*) (Pleguezuelos *et al.* 2010) o las subespecies del lagarto ocelado (*Timon lepidus nevadensis*) (Miraldo *et al.* 2011) presentan un patrón de distribución mediterráneo al igual que *P. hespericus*. En algunos de estos casos, la fragmentación histórica de las poblaciones ha originado historias evolutivas independientes y regiones de contacto secundario reciente entre ellas.

Los linajes mitocondriales dentro de *Salamandra salamandra*, geográficamente subdivididos, coinciden con tres subespecies reconocidas, una en la zona de Algarve (*Salamandra salamandra crespoides*), otra en las sierras centrales (*Salamandra salamandra almanzoris*) y en el tercio norte del río Guadalquivir (*Salamandra salamandra morenica*), lo que indica refugios recientes para esta especie (García-París *et al.* 2003; Reis *et al.* 2011). Por otro lado, *Chioglossa lusitanica*, habita arroyos en áreas boscosas húmedas en el noroeste de la Península Ibérica. El estudio detallado de la variación de ADNmt y alozimas, reveló un alto grado de subdivisión genética, con poblaciones al sur del río Mondego, muy distinta de las poblaciones del norte (Alexandrino *et al.* 2000). La filogeografía de esta salamandra se exploró en toda su área de distribución geográfica utilizando la variación de un fragmento de citocromo b (Alexandrino *et al.*, 2002) y el patrón encontrado sugiere la presencia de un mínimo de dos refugios. Los autores sugieren que el nivel de divergencia entre los dos linajes principales (1,5%) refleja la divergencia de finales del Plioceno al Pleistoceno temprano (hace entre 3 a 1.5 millones de años). *Alytes* spP., por otra parte, presenta un alto nivel de variación geográfica, lo que ha llevado a la descripción de cinco especies y cuatro subespecies al interno de *A. obstetricans* con distribuciones parapátricas basadas en alozimas y diferencias morfológicas (Arntzen y García-París,

1995; García-París y Martínez-Solano 2001; Maia-Carvalho *et al.* 2014a). Análisis filogeográficos más recientes basados en la variación de secuencias de mitocondrial y nuclear han establecido una diferenciación geográfica que indica la aparición de múltiples refugios Pleistocénicos (Fonseca *et al.*, 2003; Maia-Carvalho *et al.* 2014b). La medida en que estas subespecies hibridan y los límites de distribución deben ser aún investigados, no obstante, la secuencia de divergencia entre ellos sugiere que la radiación en *A. obstetricans* ocurrió alrededor de 3,5 millones de años (Arntzen y García-París 1995; Fonseca *et al.*, 2003).

La presencia de *Pelodytes* en la Meseta Norte se remonta por lo menos hasta el Pleistoceno temprano en Atapuerca (Cuenca-Bescós *et al.*, 2010) y está relativamente bien documentada en otros sitios (más recientes) dentro de la gama actual de este linaje (por ejemplo, ver Blain *et al.*, 2007, 2011). Dado que *P. atlanticus* y *P. ibericus* divergieron en primer lugar, nuestros resultados sugieren una colonización ibérica inicial en dirección este-oeste, seguido por los linajes más nororientales de *P. hespericus* y *P. punctatus*, especies hermanas que habitan Europa y gran parte de la Península Ibérica durante el Pleistoceno. Los datos moleculares son apoyados por la presencia en el registro fósil de restos adscritos a *P. punctatus sensu lato*, a lo largo de todo el Pleistoceno, y por su ausencia en el norte de África (Busack, 1977; Sanchíz *et al.* 2002; Martínez-Solano y Sanchíz, 2005; Pleguezuelos *et al.* 2008; Blain *et al.*, 2008a, b; Blain *et al.*, 2009). De acuerdo con nuestras estimas, restos fósiles atribuidos específicamente a *P. ibericus* no fueron encontrados más allá del Pleistoceno superior.

En base al registro fósil disponible en la actualidad, las edades de divergencia y los eventos paleogeográficos producidos a lo largo del Plioceno y Pleistoceno en la Península Ibérica, parece razonable asumir que, al igual que ocurre en otros taxones de anfibios, cada uno de las distintos clados constituyen unidades filogeográficas independientes que se desarrollaron en refugios ibéricos aislados durante los periodos glaciales. Los índices en los niveles de variabilidad encontrados, el patrón geográfico de la variación existente y la patente estructura, permiten inferir las historias demográficas recientes y tratar de localizar los núcleos que apuntan a un putativo refugio glacial para las distintas especies del gen. *Pelodytes* en la Península.

Los diferentes linajes muestran historias demográficas distintas. La explicación más plausible para la escasa variabilidad genética dentro de los linajes de *P. ibericus* y *P. hespericus* hace pensar en fluctuaciones demográficas. Los niveles comparativamente bajos de diversidad genética, en relación al resto de clados, encontrados al interno de *P. ibericus* y *P. hespericus*, unido a la distribución bimodal en los análisis de Mismatch, sugieren una posible expansión reciente de los rangos de distribución en estas dos especies. Las pruebas de expansión demográfica resultaron significativas para los dos clados. Las condiciones climáticas más duras del centro de España pueden haber sometido a las poblaciones de *Pelodytes* a fuertes fluctuaciones demográficas a través del tiempo que han borrado toda huella de estructura. Aunque no queda claro qué circunstancias rigen las tendencias demográficas a largo plazo

en *P. ibericus* los estudios en las zonas de contacto, corroboran unos patrones de expansión que llegan hasta el momento presente. La presencia de fósiles de *P. ibericus* exclusivamente en el sur de la Península Ibérica (Barroso y Bailón, 2003) y las divergencias con el resto de linajes, sugieren un aislamiento prolongado hasta un contacto secundario reciente, como veremos a continuación.

La estructura encontrada en las especies del actual límite suroccidental, *P. atlanticus*, y más nororiental, *P. punctatus*, del rango de distribución del clado, concentra regiones con elevados niveles de diversidad genética que sugieren un núcleo cercano al centro de divergencia y/o posible refugio glacial para estas especies.

Dentro del rango de distribución actual de *P. atlanticus*, los niveles máximos de variabilidad genética se encuentran claramente en la región sur hasta la zona de contacto con *P. ibericus*. El resto de localidades de Portugal se encuentra en una sola rama del árbol filogenético y las redes de haplotipos con escaso número de ellos en comparación con el total (ver capítulos uno y dos). Esto sugiere que el límite de distribución sur pudo haber constituido un centro cercano al área de refugio en el pasado, un patrón geográfico que presenta notables similitudes con el de otros organismos de distribución atlántica, sean anfibios (Gonçalves *et al.* 2009; Martínez-Solano *et al.* 2006; Reis *et al.*, 2011), reptiles (Paulo *et al.* 2008) o peces (Mesquita *et al.* 2005).

En el interior de *P. punctatus* aparecen claramente dos sublinajes diferenciados, coincidentes entre distintos marcadores y correspondientes a dos zonas geográficas concretas: un primer sublinaje presente en la Península Ibérica y ampliamente distribuido desde NE España hasta el norte de Francia, y un segundo sublinaje, encontrado en la región sureste del rango de distribución (en el NW de Italia y SE de Francia). En las localidades adscritas al primero, nuestros análisis pusieron de manifiesto, de nuevo, un mayor grado de variabilidad genética en el límite sur de su distribución con la presencia de un único haplotipo en toda Francia. Esta subdivisión en sub-clados, con núcleo de variabilidad en el sur, sugiere la existencia de un corredor a lo largo del río Garona que constituiría una ruta de colonización Mediterráneo-Atlántica en época reciente. Por otra parte, los altos niveles de variabilidad genética encontrados en todos los marcadores analizados y la divergencia en las localidades del sureste de Francia y norte de Italia, sugieren una interrupción histórica del flujo génico. Un análisis filogeográfico detallado, partiendo de un muestreo a escala y la exploración de los patrones de mezcla e introgresión permitiría conocer bien las causas y datar el posible origen de este proceso, así como estimar sus consecuencias. Hemos de tener en cuenta no obstante, que aunque la variación genética existente siga en la actualidad un patrón determinado apuntando a unos posibles refugios glaciales, no constituye una prueba fehaciente de que los núcleos poblacionales estén exactamente en las mismas áreas que ocuparon durante los ciclos climatológicos adversos (Miraldo, 2012).

Aunque puede dar la impresión de que los subrefugios sólo tuvieron lugar en regiones meridionales, la diversidad actual no es medida de la diversidad del pasado, sino únicamente su

consecuencia. Hemos de ser conscientes de que, dados los yacimientos fósiles de *Pelodytes*, las expansiones en Iberia desde regiones de Centroeuropa tuvieron que sucederse repetidas veces y en un largo proceso, provocando la fragmentación e incluso extinción de algunos grupos poblacionales pasados. De estos núcleos que tuvieron lugar en el pasado también en refugios fuera de las penínsulas meridionales del Mediterráneo no han quedado vestigios. El modelo de estudio que nos ocupa, con dos especies endémicas y sistemas para los cuales existe distribución fuera de Iberia, permite ampliar la visión y perspectiva de las observaciones precedentes.

En estudios anteriores, a partir de un número limitado de datos genéticos y/o registros bioacústicos, se extrapolan conclusiones de manera más o menos global; es el caso de van de Vliet *et al.* (2012) o Sánchez-Herráiz *et al.* (2000). En el caso de Paillete *et al.* (1992), a partir de los datos obtenidos de un número muy restringido de poblaciones- una población de *P. ibericus* de Algarve, al sur de Portugal y dos poblaciones de *P. punctatus* procedente de Liguria (Italia) y la Camargue francesa- los autores señalan variedades dialectales al interno de las poblaciones de *Pelodytes* (en ese momento *P. punctatus*) que sirvieron de base a la discusión en las investigaciones genéticas posteriores. Pargana *et al.* 2003 y Sánchez-Herráiz *et al.* 2000 describieron, desde sendos trabajos y con cierta precisión, las diferencias entre las poblaciones del sur de la península Ibérica (*P. ibericus*), considerando el resto perteneciente a una única especie (*P. punctatus*). Pargana (1998) considera las diferencias locales encontradas en la región suroeste de la península resultado del proceso de especiación de *P. ibericus* y asigna al resto de localidades estudiadas (centro y costa suroeste portuguesa) al taxón *P. punctatus*. En el caso de Sánchez-Herráiz *et al.* (2000) el diseño del muestreo permitió, en primer lugar, distinguir las características osteológicas de ejemplares pertenecientes a localidades del sur de España y Portugal (MNCN 18153-18158 - Porto Covo, Baixo Alentejo) que en nuestro estudio comprende el rango de distribución de *P. atlanticus* y *P. ibericus*, y en segundo, remarcar la diferenciación genética y bioacústica de la población barcelonesa en el conjunto de las localidades analizadas. Esta peculiaridad puesta en el contexto de todo el rango de distribución muestra que era realmente la clave para entender que las poblaciones de *Pelodytes punctatus sensu lato* del interior de la Península Ibérica pertenecían a una unidad filogenética diferente con origen e historia evolutiva independiente en Europa occidental. A pesar de la ausencia, en el estudio referido, de localidades fuera de la península Ibérica, los autores identifican el origen de los linajes como un solo evento de cladogénesis (entre el linaje suroeste y el norte) cuando se trataba de a su vez de dos eventos más, lo que sugeriría un escenario biogeográfico diferente. Esto describe, ciertamente el modo en el que funciona el conocimiento científico, construyendo un peldaño sobre el anterior, pero evidencia de alguna manera, la importancia de la escala en la que nos movemos, la perspectiva del observador y las dificultades de extrapolar unos resultados globales a partir de un número limitado de datos. Mientras el tipo de marcadores utilizados, junto con un muestreo incompleto, puede limitar las conclusiones de un estudio, como ocurre en el caso de los primeros estudios basadas en marcadores

mitocondriales, es evidente que el uso de marcadores con tasas de evolución lenta daría más fuerza a nuestras conclusiones o por el contrario, sería necesario considerar escenarios alternativos.

Nuestra hipótesis sugiere, en primer lugar, una expansión inicial hacia la Península Ibérica en épocas Plio-Pleistocénicas, seguido de una diferenciación de las unidades evolutivas en sucesivas etapas y en refugios glaciales separados y, por último, una expansión post-glacial hacia el norte en periodos interglaciares que continuó hasta la actualidad.

Tanto la presencia de discordancia cito-nuclear como la aparición de diferentes clados mitocondriales en las mismas localidades en las que aparecen individuos híbridos para distintos marcadores nucleares, puso en evidencia la existencia de contacto secundario entre las especies. Teniendo en cuenta la distribución completa de las especies, las poblaciones mezcladas e individuos híbridos son raros (Díaz-Rodríguez *et al.* 2015) y sólo presentes en las zonas limítrofes de contacto secundario entre ellas. Puesto que estábamos interesados especialmente en la identificación de la aparición y el grado de hibridación, efectuamos un análisis detallado basado en marcadores de evolución rápida (capítulo tercero) para detectar patrones de introgresión y mezcla, específicamente en las zonas de contacto. La existencia de dos zonas de contacto secundario a consecuencia de la aparente expansión reciente de *P. ibericus* en el sur de la península Ibérica (ver Díaz-Rodríguez *et al.*, 2015), da lugar a un escenario diferente según se trate de las especies *P. atlanticus* a oeste, o *P. hespericus* a este.

En general, nuestros resultados muestran segregación entre dos patrones que se comportan de manera marcadamente distinta. En el contacto secundario reciente entre *P. atlanticus* y *P. ibericus*, aparece una zona de mezcla donde, a pesar de ser detectada cierta introgresión, existe una barrera al flujo génico que ha permitido la existencia de esta zona de contacto hasta el momento presente de nuestro estudio. Las razones que pueden estar en el origen de esta zona son diversas. En primer lugar, en base a nuestra hipótesis, el componente filogenético fruto de una diversificación no es tan marcado como en el caso de *P. hespericus*. Esto ha podido dar lugar a que el proceso de aislamiento reproductivo no se haya completado, cuyo resultado son los niveles de introgresión considerables, sobre todo en marcadores mitocondriales. En este caso, la única causa de diferencia no estarían relacionadas tanto con la adaptación diferencial al hábitat ecológico local de las especies, como sugería Pargana (1998), sino a las historias evolutivas independientes. Desde un punto de vista ecológico, las regiones del sur de Portugal donde se encuentran los hábitats elegidos por ambas especies para la reproducción, pertenecen a la misma región climática, característica de la cuenca mediterránea, sin solución de continuidad entre ambas distribuciones. El hábitat reproductivo de las especies presenta gran similitud, con charcas temporales estacionales y efímeras, que se forman exclusivamente en la época de lluvias y se secan en la época estival.

Por otro lado, la fenología de las especies tampoco difiere significativamente en esta área y encontramos a las especies en simpatria estricta en diversas localidades de la zona de contacto. En base a nuestras propias observaciones, la escasa diferenciación en los patrones de fisiología térmica entre las dos especies (Katzenberger *et al.*, datos no publicados) pone de relieve la ausencia aparente de divergencias funcionales que pudieran estar en el origen de la segregación en ambas distribuciones. Aunque existen diferencias fisiológicas, atribuidas en principio a la divergencia filogenética de ambas especies, estas no se traducen en valores significativos desde un punto de vista ecológico, es decir, las diferencias fisiológicas aunque son significativas, no estarían condicionando la distribución actual de las especies. A la espera de un estudio detallado de nicho ecológico mediante modelos robustos de distribución de especies (SDM), que permitan identificar las diferencias potenciales y su papel en el proceso de especiación (Fitze *et al.*, 2011), consideramos que el factor que condiciona en mayor medida los patrones de mezcla en esta zona de contacto, es principalmente intrínseco.

Del resultado del análisis bioacústico de la llamada de apareamiento del macho entre las poblaciones de *P. atlanticus* y *P. ibericus*, no obstante, pueden apreciarse niveles significativos de diferenciación en el número de notas B que forman parte de la secuencia del canto. Por otra parte, los estudios previos (Pargana, 1998) de las características del canto en localidades adscritas a una y otra especie apuntaban a diferencias en la composición de la llamada de apareamiento. Aunque presentes, no conocemos hasta qué punto las diferencias en estas características del canto tienen significación biológica, y en cualquier caso, no supone *per se* una prueba de la existencia de una barrera efectiva de aislamiento pre-cigótico y de su relación con la segregación espacial de la variación genética encontrada. Para evaluar su papel sería necesario investigar la respuesta de las hembras a la llamada de apareamiento del macho mediante experimentos de fonotaxis que permitan analizar el efecto de las llamadas como carácter seleccionado por las hembras entre ambas especies.

Por otro lado, los patrones de variabilidad genética no parecen deberse al aislamiento por distancia y los test de Mantel resaltan la ausencia de correlación entre las distancias genéticas y geográficas, especialmente dentro de esta zona de contacto. Por tanto, esta no se trata de la principal, ni única fuerza que actúa sobre la variación espacial de las frecuencias alélicas. Por el contrario, la falta de correlación, corrobora la estructura poblacional y la existencia de algún tipo de barrera para la dispersión y el flujo génico que se mantiene de forma más o menos prolongada en el tiempo si consideramos el periodo de contacto secundario.

A pesar de la presencia de individuos híbridos y la ausencia de una diferenciación nuclear clara entre localidades pertenecientes a distintos linajes mitocondriales, los patrones de estructura heterogénea ponen de manifiesto la existencia de una zona de contacto fruto de la tensión de fuerzas intrínsecas, afectadas de una parte por la inmigración parental y la emigración de genotipos híbridos y de otra por la selección en contra de los híbridos. La

presencia de clinas coincidentes en el espacio para distintos loci diagnósticos, el desequilibrio de ligamiento, así como las estimas de pérdida de flujo génico son la mejor muestra de selección en contra de los híbridos, debida en mayor parte a factores genéticos intrínsecos que abióticos.

Las desviaciones en el equilibrio de H-W y desequilibrio gamético entre marcadores sugieren una situación de contacto prolongada en el tiempo, con una franja longitudinal más o menos estrecha (36 km), donde se detecta estructura e interrupción del flujo génico y que responde de manera diferencial para el ADN mitocondrial y el ADN nuclear como evidencia la discordancia citonuclear entre distintos marcadores. A la luz de estos patrones de mezcla, si consideramos que ambas especies se dispersan por igual, la introgresión bien patente del genotipo mitocondrial y nuclear de *P. ibericus* sobre las poblaciones de *P. atlanticus* a lo largo de toda la franja de contacto, parece indicar que la expansión reciente detectada en los patrones genéticos continúa al interno del clado.

Por el contrario, los patrones de variación genética en la zona de contacto a oeste del límite de distribución de *P. ibericus*, muestran una notable barrera al flujo génico con ausencia casi total de introgresión y mezcla. El contacto secundario y reciente entre los linajes de *P. hespericus* y *P. ibericus* en el sur de la Península, parece marcado por una profunda huella genética, resultado de una fragmentación histórica anterior en el tiempo y factores de segregación en el hábitat ecológico de las especies. La fuerte estructura poblacional y los patrones no coincidentes entre los distintos loci a largo del transecto, evidencian el escaso grado de flujo génico detectado en los análisis de frecuencia. Por otra parte, el análisis de la varianza molecular confirma estas diferencias de variación nuclear dentro de los linajes mitocondriales, así como en el análisis bayesiano, aparece una marcada ruptura cuando se pasa de un área de distribución a otra. Aunque hay cierta introgresión, esta zona de contacto se caracteriza por escasos niveles de mezcla, probablemente debido a la presencia de individuos migrantes.

En la línea de los estudios precedentes (Pargana, 1998; Sánchez-Herráiz, 2004; de Amaral, datos no publicados), las diferencias significativas encontradas en la composición del canto en *P. hespericus*, muy distinta de los otros tres linajes, estaría marcando un posible factor de aislamiento reproductivo pre-cigótico o al menos, la diferenciación a nivel específico de un carácter marcadamente ligado al reconocimiento mutuo y la reproducción, reconocido como carácter de aislamiento pre-cigótico en anuros (Höbel y Gerhardt 2003, Gerhardt 2013). Sin embargo, como apuntábamos anteriormente, para evaluar la influencia y funcionalidad de esta diferenciación entre los linajes es necesario, el estudio experimental de la respuesta de las hembras y su elección discriminante a la llamada de apareamiento entre ambas especies.

Por otra parte, la patente segregación fenológica entre las especies de las poblaciones de *P. ibericus* y *P. hespericus* de la zona de contacto, evidencian ciertas diferencias en el tipo de hábitat reproductivo, más temporal y efímero en el caso de *P. ibericus* y *P. atlanticus*, que en *P. hespericus*

donde tiende a reproducirse en charcas y arroyos estacionales pero más permanentes que en los casos anteriores. En base a nuestras observaciones, la diferenciación fenológica se encuentra determinada, por una parte, por un factor altitudinal. En la meseta de Castilla-La Mancha y las Sierras orientales de Jaén, Granada y Almería este patrón debería verse reflejado en las temperaturas mínimas, que ocurren de noche y limitan, por tanto, la actividad de los coros. Las puestas de *Pelodytes hespericus* se retrasan, dando lugar al desplazamiento fenológico observado entre sus poblaciones y las de *P. ibericus* en el valle del Guadalquivir y Sierra Morena. El estudio detallado en los patrones fisiológicos podría demostrar si existe o no una tendencia en los caracteres observados (datos no publicados). El estudio del nicho ecológico realizado a través de modelos de distribución de especies, confirmarían, o no, nuestra hipótesis de segregación en cuanto al hábitat, aunque estos modelos quizás sean imprecisos desde el momento en que se basan en información climática y no en información biológica sobre la diferenciación potencial en la fisiología térmica entre los distintos linajes (Buckley y Kingsolver, 2012). No obstante, podemos inferir algunas diferencias de las áreas de reproducción elegidas por las especies. Las características ambientales en las que se encuentra distribuido en la actualidad *P. ibericus*, propias del sur de la Península Ibérica (clima mediterráneo con temporada de lluvias estacionales y temperaturas cálidas en verano superiores a los 22 °C, según la clasificación climática de Köppen), estarían estrechamente relacionadas con una marcada estacionalidad, veranos cálidos y secos y especialmente caracterizados por la irregularidad en las precipitaciones. En este hábitat, en la zona de contacto española *P. ibericus* tendería a reproducirse antes y ocupar áreas más cálidas y de menor altitud, mientras que *P. hespericus* se distribuiría a más altitud, mostrando preferencia por zonas particularmente más húmedas y frías en periodos más prolongados. Cabe también cuestionar, si el aumento de temperatura puede estar relacionado con los factores que condicionan la expansión de esta especie; los valores de tolerancia al calentamiento global ($CT_{max} - T_{max}$, temperatura crítica máxima para la especie menos la temperatura máxima a la que está expuesta) podrían mostrar una posible selección térmica relacionada con la migración de los parentales. En el futuro sería interesante estudiar la variación geográfica en los límites de esta tolerancia. En cualquier caso, son necesarios estudios en profundidad que vengán a contrastar los tiempos de divergencia entre los taxones estudiados y la segregación en el hábitat reproductivo, especialmente en la zona de contacto española entre *P. ibericus* y *P. hespericus*.

En base al análisis filogenético expuesto en el capítulo dos de esta tesis, la diversificación de las especies *P. ibericus* y *P. atlanticus* podría estar relacionada con los patrones de mezcla encontrados y con la presencia, poco frecuente y restringida a la zona de contacto, de distintos haplotipos mitocondriales, en ausencia de diferenciación nuclear. Esto puede ser interpretado como una firma de introgresión que indica que el aislamiento reproductivo no se ha completado. Mientras que en *P. hespericus* las profundas divergencias filogenéticas, además de las características del hábitat, podrían estar en la base de la segregación entre ambos linajes. No obstante, tanto el análisis bayesiano de

STRUCTURE como el análisis principal de coordenadas (PCoA) segregan perfectamente en los ejes principales las localidades pertenecientes a uno y otro grupo poblacional en ambas zonas de contacto.

Las diferencias fenotípicas estudiadas, aunque presentan dificultades de análisis debido al carácter críptico de las especies, reflejan divergencias interespecíficas en las poblaciones de *Pelodytes* en la Península, probablemente debido a episodios aislamientos históricos que respaldan las delimitaciones específicas propuestas. Nuestros resultados apoyan la existencia de subrefugios glaciales dentro de Iberia y su papel en el fomento de estas divergencias. Un análisis exhaustivo, tanto del área de distribución como de las zonas de contacto, ligadas a los diferentes hábitats y la especificidad de nicho ecológico mediante Modelos de Distribución de Especies, contribuiría al conocimiento de la especiación dentro de este complejo críptico de especies.

La presente tesis pretende contribuir a esclarecer los patrones filogeográficos de especies con distribución atlántica y mediterránea, especialmente aquellas que se extienden en el interior de la Península Ibérica, permitiendo ampliar el conocimiento de los procesos evolutivos presentes e históricos que han dado lugar a ser considerado en la actualidad uno de los centros de diversidad biológica más importantes del mundo. Además, esta tesis quiere contribuir a la progresiva aparición de estudios comparativos que han permitido analizar en su conjunto las peculiaridades climatológicas, geográficas y paleontológicas en áreas del sur de Europa y, en particular, el papel principal de las oscilaciones climáticas pasadas, que han determinado en gran medida los patrones actuales de diversidad genética de los organismos. Aunque la Península Ibérica es uno de los refugios glaciales más estudiados en términos filogeográficos (Alexandrino *et al.* 2002, Veith *et al.* 2003; Paulo *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.* 2009; Martínez-Solano *et al.* 2004; 2006; Gómez y Lunt, 2007; Reis *et al.*, 2011; Stöck *et al.* 2012; Miraldo, 2012; Maia-Carvalho *et al.* 2014), este análisis no sería posible sin el uso de sistemas de especies atlántico-mediterráneas co-distribuidas y modelos evolutivos, como el presente.

Para comprender la evolución de la biodiversidad y asegurar su conservación es crítico conocer la historia evolutiva de las especies. Como escribió el padre de la Filogeografía, un objetivo prioritario de la biología de la conservación debe ser evitar defoliar aún más el árbol de la vida (Avise, 2005). La conservación de las especies es, en definitiva, la conservación del resultado de un largo proceso evolutivo. Aunque esta tesis no está enfocada en la biología de la conservación, sus implicaciones también son importantes a este nivel. La adición de las especies de *Pelodytes* a un grupo cada vez mayor de taxones con reservorios genéticos importantes en esta región, que los convierten en "refugios dentro de refugios" ibéricos clave (Gómez y Lunt, 2007; Abellán y Svenning, 2014) también tiene fuertes implicaciones para la planificación de la conservación. Explorar la diversidad críptica y esclarecer la situación actual de las poblaciones del género *Pelodytes*, debería ser una de las tareas primordiales para la preservación y el manejo de los hábitat reproductivos de estos anfibios,

especialmente de los estanques temporales mediterráneos, en evidente retroceso debido a la fragmentación y pérdida de hábitats (Ferreira y Beja, 2013). El aporte de la Genética a la Biología de la Conservación en este punto es crucial a medio y largo plazo: el futuro de una población sometida a cualquier grado de amenaza está directamente relacionado con su diversidad genética. El futuro de la biodiversidad depende, en última instancia, de la diversidad genética de las especies.

El acelerado ritmo con el que se está reduciendo la biodiversidad del planeta (debido a que la tasa de extinción supera con mucho a la tasa de origen de nuevas especies) ha llevado a algunos autores a nombrarla la *sexta extinción* (Leakey y Lewin, 1995; Wilson, 1992) y equipararla a las cinco previas extinciones masivas ocurridas en los últimos 600 millones de años, con la trágica salvedad del protagonismo que nos atañe. En un mundo donde la biodiversidad se encuentra amenazada, deberíamos preservar la mayor variabilidad genética posible, también a nivel intraespecífico, puesto que de ella depende la capacidad de adaptación de las especies frente a nuevas presiones selectivas (incluidas las de origen antrópico). El diseño y aplicación de marcadores moleculares que aseguren la correcta caracterización genética de las especies se convierte por tanto en un paso obligatorio para mejorar nuestra manera de entender y gestionar la naturaleza y sus recursos (Centeno-Cuadros, 2009). Las implicaciones de la Filogeografía en la Biología de la Conservación son inmediatas: frente al objetivo de preservar la mayor parte de la diversidad genética de una especie debemos conocer su distribución en el espacio y los procesos históricos que la han originado. De este modo podemos centrarnos en conservar las poblaciones que han permanecido históricamente aisladas (unidades evolutivamente significativas o ESUs) (Moritz, 1994a; Moritz, 1994b), generalmente representadas como grupos monofiléticamente recíprocos y, por tanto, conservando en cierta manera la historia evolutiva de cada especie.

A continuación pasamos a enumerar las conclusiones más importantes de la presente tesis doctoral.

Referencias

- Abellán, P., Svenning, J.C., (2014). Refugia within refugia—patterns in endemism and genetic divergence are linked to Late Quaternary climate stability in the Iberian Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society* 113, 13–28.
- Ahmadzadeh, F., Carretero, M. A., Harris, D. J., Perera, A., y Böhme, W. (2012). A molecular phylogeny of the eastern group of ocellated lizard genus *Timon* (Sauria: Lacertidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Amphibia-Reptilia*, 33(1), 1-10.
- Alexandrino, J., Froufe, E., Arntzen, J. W., y Ferrand, N. (2000). Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology*, 9(6), 771-781.
- Alexandrino, J., Arntzen, J. W., y Ferrand, N. (2002). Nested clade analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Heredity*, 88(1), 66-74.
- Arntzen, J. W., y García-París, M. (1995). Morphological and allozyme studies of midwife toads (genus *Alytes*), including the description of two new taxa from Spain. *Contributions to zoology*, 65(1), 5-32.
- Barroso, C., Bailón, S. (2003). Los anfibios y los reptiles del Pleistoceno superior de la Cueva del Boquete de Zafarraya (Málaga, España). En: C. Barroso Ruiz (ed.), *El Pleistoceno superior de la Cueva del Boquete de Zafarraya*. Arqueología Monografías 15. Consejería de Cultura, Junta de Andalucía, Sevilla, Spain. pp. 267-278.
- Blain, H.A., Bailón, S. y Agustí, J. (2008a) Amphibians and squamate reptiles from the latest early Pleistocene of Cueva Victoria (Murcia, southeastern Spain, SW Mediterranean): paleobiogeographic and paleoclimatic implications. *Geologica Acta*, 6, 345–361.
- Blain, H.A., Bailón, S. y Cuenca-Bescós, G. (2008b) The Early-Middle Pleistocene palaeoenvironmental change based on the squamate reptile and amphibian proxies at the Gran Dolina site, Atapuerca, Spain. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 261, 177–192.
- Blain, H.A., Bailón, S., Cuenca-Bescós, G., Arsuaga, J. L., Bermúdez de Castro, J. M. y Carbonell, E. (2009) Long-term climate record inferred from early-middle Pleistocene amphibian and squamate reptile assemblages at the Gran Dolina Cave, Atapuerca, Spain. *Journal of Human Evolution*, 56, 55–65.
- Blain, H., Bailón, S., Agustí, J., (2007). Anurans and squamate reptiles from the latest Early Pleistocene of Almenara-Casablanca-3 (Castellón, East of Spain). Systematic, climatic and environmental considerations. *Geodiversitas* 29, 269–295.
- Blain, H.A., López-García, J.M., Cuenca-Bescós, G., (2011). A very diverse amphibian and reptile assemblage from the late Middle Pleistocene of the Sierra de Atapuerca (Sima del Elefante, Burgos, Northwestern Spain). *Geobios* 44, 157–172.
- Blain, H.A. y Bailón, S. (2003) Les amphibiens et les reptiles des couches du Pléistocène supérieur ancien du gisement d'Artenac (Charente, France). *Quaternaire*, 14, 85–95.
- Blain, H.A., (2009). Contribution de la paléoherpétofaune (Amphibia y Squamata) à la connaissance de l'évolution du climat et du paysage du Pliocène supérieur au Pléistocène moyen d'Espagne. *Treb. Mus. Geol. Barcelona* 16, 39-170.
- Buckley L.B. & Kingsolver, J.G. (2012) Functional and phylogenetic approaches to forecasting species' responses to climate change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2012. 43:205–26
- Busack, S.D. (1977). Zoogeography of amphibians and reptiles in Cadiz province, Spain. *Annals of Carnegie Museum*, 46, 285–316.
- Busack, S. D., Salvador, A., y Lawson, R. (2006). Two new species in the genus *Psammotromus* (Reptilia: Lacertidae) from the Iberian Peninsula. *Annals of Carnegie Museum*, 75(1), 1-10.
- Centeno-Cuadros (2009). “Del individuo a las especies: genética del paisaje y filogeografía de la rata de agua (*Arvicola sapidus*)”. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla
- Cuenca-Bescós, G., Rofes, J., López-García, J.M., Blain, H.-A., De Marfá, R., Galindo-Pellicena, M.A., Bennàsar, M., Melero-Rubio, M., Arsuaga, J.L., Bermúdez de Castro, J.M., Carbonell, E., (2010). Biochronology of Spanish Quaternary small vertebrate faunas. *Quaternary International* 212, 109–119.
- Crespo EG, Marquez R, Pargana J, Tejedo M (2010) *Pelodytes* spp. In: Loureiro A *et al* (eds) Atlas dos anfibios e répteis de Portugal. *Esfera do Caos*, Lisboa, pp 112–115
- Delfino, M. (2002). Erpetofaune italiane el Neogene e del Cuaternario. *Tesi di Dottorato*, Università degli Studi di Modena e Regio Emilia, Modena.
- Delfino, M. (2004) The Middle Pleistocene herpetofauna of Valdemino cave (Liguria, North-Western Italy). *Herpetological Journal*, 14, 113–128.
- Díaz-Rodríguez, J., Gonçalves, H., Sequeira, F., Sousa-Neves, T., Tejedo, M., Ferrand, N. y Martínez-Solano, I. (2015) Molecular evidence for cryptic candidate species in Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 224–241.
- Eldredge, Niles y Gould S. J. (1972). Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. In T.J.M. Schopf, ed., *Models in Paleobiology*. San Francisco: Freeman, Cooper and Company, pp. 82-115.
- Ferreira, M., y Beja, P. (2013). Mediterranean amphibians and the loss of temporary ponds: Are there alternative breeding habitats?. *Biological conservation*, 165, 179-186.
- Fitze, P.S., Gonzalez-Jimena, V., San-Jose, L.M., San Mauro, D., Aragon, P., Suarez, T., Zardoya, R., 2011. Integrative analyses of speciation and divergence in *Psammotromus hispanicus* (Squamata: Lacertidae). *BMC Evol. Biol.* 11, 347.
- Fonseca, A., Arntzen, J.W., Crespo, E.G. y Ferrand, N. (2003) Regional differentiation in the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in Portugal: a picture from mitochondrial DNA. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 10, 83–89.

- Fromhage, L., Vences, M., y Veith, M. (2004). Testing alternative vicariance scenarios in Western Mediterranean discoglossid frogs. *Molecular phylogenetics and evolution*, 31(1), 308-322.
- García-París, M., Alcobendas, M., y Alberch, P. (1998). Influence of the Guadalquivir river basin on mitochondrial DNA evolution of Salamandra salamandra (Caudata: Salamandridae) from southern Spain. *Copeia*, 173-176.
- García-París, M., Buchholz, D., Parra-Olea, G., (2003). Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28, 12-23.
- García-París M. y Martínez-Solano, I. (2001) Nuevo estatus taxonómico para las poblaciones iberomediterráneas de Alytes obstetricans (Anura: Discoglossidae). *Revista Española de Herpetología*, 15, 99-113.
- Gómez, A., Lunt, D., (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. *Phylogeography in Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity* 155-188.
- Gonçalves, H., Martínez-Solano, I., Pereira, R.J., Carvalho, B.M., García-París, M., Ferrand, N., (2009). High levels of population subdivision in a morphologically conserved Mediterranean toad (*Alytes cisternasii*) result from recent, multiple refugia: evidence from mtDNA, microsatellites and nuclear genealogies. *Molecular Ecology* 18, 5143-5160.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359(1442), 183-195.
- Höbel G & Gerhardt CH (2003) Reproductive character displacement in the acoustic communication system of green tree frogs (*Hyla cinerea*). *Evolution*, 57(4) 894-904
- Holman, J.A. (1998) Pleistocene Amphibians and Reptiles in Britain and Europe. *Oxford Monographs on Geology and Geophysics*, 38, Oxford University Press, New York
- Hotz, H. (1971) Analyse des Paarungsrufes von *Pelodytes punctatus* (Daudin 1803) (Amphibia, Pelobatidae). *Experientia*, 27, 851-852.
- Gerhardt, C. (2013). Geographic variation in acoustic communication: reproductive character displacement and speciation. *Evol Ecol Res*, 15, 605-632.
- Kuo, C. H., y Avise, J. C. (2005). Phylogeographic breaks in low-dispersal species: the emergence of concordance across gene trees. *Genetica*, 124(2-3), 179-186.
- Leakey R, Lewin R (1995) The sixth extinction: biodiversity and its survival Doubleday, New York.
- Maia-Carvalho, B., Gonçalves, H., Martínez-Solano, I., Gutiérrez-Rodríguez, J., Lopes, S., Ferrand, N., y Sequeira, F. (2014). Intraspecific genetic variation in the common midwife toad (*Alytes obstetricans*): subspecies assignment using mitochondrial and microsatellite markers. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 52(2), 170-175.
- Paulo, O. S., Jordan, W. C., Bruford, M. W., y Nichols, R. A. (2002). Using nested clade analysis to assess the history of colonization and the persistence of
- Maia-Carvalho, B., Gonçalves, H., Ferrand, N., y Martínez-Solano, I. (2014). Multilocus assessment of phylogenetic relationships in Alytes (Anura, Alytidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 79, 270-278.
- Martín, C. y Sanchíz, B. (2015) Lisanfos KMS. Version 1.2. Online reference accessible at <<http://www.lisanfos.mncn.csic.es/>> (accessed 1 December 2015). Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. Madrid, Spain.
- Martínez-Solano, I., Gonçalves, H. A., Arntzen, J. W., y García-París, M. (2004). Phylogenetic relationships and biogeography of midwife toads (Discoglossidae: Alytes). *Journal of Biogeography*, 31(4), 603-618.
- Martínez-Solano, I., Teixeira, J., Buckley, D., García-París, M., (2006). Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology* 15, 3375-3388.
- Martínez-Solano, I., y Sanchiz, B. (2005). Anfíbios y Reptiles del Pleistoceno medio de Ambrona (Soria). <http://www.researchgate.net/> (Consultado 10/12/2015)
- Mesquita, N., Hänfling, B., Carvalho, G. R., y Coelho, M. M. (2005). Phylogeography of the cyprinid *Squalius aradensis* and implications for conservation of the endemic freshwater fauna of southern Portugal. *Molecular Ecology*, 14(7), 1939-1954.
- Miraldo, A., Hewitt, G. M., Paulo, O. S., y Emerson, B. C. (2011). Phylogeography and demographic history of *Lacerta lepida* in the Iberian Peninsula: multiple refugia, range expansions and secondary contact zones. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 170.
- Miraldo, A., Hewitt, G. M., Dear, P. H., Paulo, O. S., y Emerson, B. C. (2012). Numts help to reconstruct the demographic history of the ocellated lizard (*Lacerta lepida*) in a secondary contact zone. *Molecular ecology*, 21(4), 1005-1018.
- Moritz, C. (1994). Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology y Evolution*, 9(10), 373-375.
- Moritz, C. (1994). Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, 3(4), 401-411.
- Paillette, (1971). Communication acoustique chez les Amphibiens anoures. *Journal Physiology* no. 3(4), 327-351
- Paillette, M., Oliveira, M.E., Rosa, H.D. y Crespo, E.G. (1992) Is there a dialect in *Pelodytes punctatus* from southern Portugal? *Amphibia-Reptilia*, 13, 97-108.
- Pargana, J. M. (1998). Características espectrais e temporais e correlações genéticas do canto de acasalamento de *Pelodytes punctatus* (Amphibia, Anura). Masters Thesis. Departamento de Biofísica. Universidade de Lisboa. 163 pp.
- Pargana, J.M., Marquez, R., Reques, R., Sánchez Herráiz, M.J., Tejedo, M., Crespo, E.G., (2003). The mating call of *Pelodytes ibericus* (Anura, Pelodytidae). *Herpetological Journal* 13, 199-204.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., y Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular*

populations of an Iberian lizard. *Molecular Ecology*, 11(4), 809-819.

Paulo, O. S., Pinheiro, J., Miraldo, A., Bruford, M. W., Jordan, W. C., y Nichols, R. A. (2008). The role of vicariance vs. dispersal in shaping genetic patterns in ocellated lizard species in the western Mediterranean. *Molecular Ecology*, 17(6), 1535-1551.

Pleguezuelos, J. M., Sá-Sousa, P., Pérez-Mellado, V., Marquez, R., y Martínez-Solano, I. (2010). *Chalcides bedriagai*.

Pleguezuelos, J. M., Fahd, S., y Carranza, S. (2008). El papel del Estrecho de Gibraltar en la conformación de la actual fauna de anfibios y reptiles en el Mediterráneo Occidental. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 19, 2-17.

Reis, D.M., Cunha, R.L., Patrão, C., Rebelo, R., Castilho, R., (2011). *Salamanca salamandra* (Amphibia: Caudata: Salamandridae) in Portugal: not all black and yellow. *Genetica* 139, 1095–1105.

Roček, Z. (2005) Late Miocene Amphibia from Rudabánya. *Palaeontographia Italica*, 90, 11–29.

Roček, Z. y Rage, J.C. (2000) Tertiary Anura of Europe, Asia, Africa, Asia, North America, and Australia. In: Heatwole, H., Carroll, R.L. (Eds.), *Amphibian Biology*. Surrey Beatty, Chipping Norton, pp.1332–1387.

Sánchez-Herráiz, M.J. (2004) Análisis de la diferenciación genética, morfológica y ecológica asociadas a la especiación en el género *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Sánchez-Herráiz, M., Barbadillo, L., Machordom, A., Sanchiz, B., (2000). A new species of pelodytid frog from the Iberian Peninsula. *Herpetologica* 56, 105–118.

Sánchez-Herráiz, M.J. (2004) Análisis de la diferenciación genética, morfológica y ecológica asociadas a la especiación en el género *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Sánchez-Herráiz, M., Barbadillo, L., Machordom, A. y Sanchiz, B. (2000) A new species of pelodytid frog from the Iberian Peninsula. *Herpetologica*, 56, 105–118.

Sanchiz, B., Tejedo, M., Sanchez-Herráiz, M., (2002). Osteological differentiation among Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Graellsia* 58, 35–68.

Stöck, M., Dufresnes, C., Litvinchuk, S.N., Lymberakis, P., Biollay, S., Berroneau, M., Borzée, A., Ghali, K., Ogielska, M., Perrin, N., (2012). Cryptic diversity among Western Palearctic tree frogs: postglacial range expansion, range limits, and secondary contacts of three European tree frog lineages (*Hyla arborea* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65, 1–9.

ecology, 7(4), 453-464.

Tejedo M, Reques R, Gasent JM, González de la Vega JP, Barnestein JM, García L, González E, Donaire D, Sánchez-Herráiz MJ y Marangoni F (2003). *Distribución de los anfibios endémicos de Andalucía: estudio genético y ecológico de las poblaciones*. Informe Técnico, Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía-CSIC, 172 pp.

Veith, M., Fromhage, L., Kosuch, J. y Vences, M. (2006) Historical biogeography of Western Palearctic pelobatid and pelodytid frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Contributions to Zoology*, 75, 109–120.

van de Vliet, M.S., Beebee, T.J., Diekmann, O.E., (2012). Genetic evidence for a distinct *Pelodytes* lineage in southwest Portugal: implications for the use of pre-developed microsatellite markers. *Conserv. Genet.* 13, 605–611.

van den Elzen, P. (1976) Remarques sur la biologie de *Pelodytes punctatus* Daudin 1802 (Amphibia, Pelobatidae) en Camargue. *Revue Française d'Aquariologie*, 3: 99–104.

Veith, M., Fromhage, L., Kosuch, J., Vences, M., (2006). Historical biogeography of Western Palearctic pelobatid and pelodytid frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Contributions to Zoology* 75, 109–120.

Vennemann, T. W., y Hegner, E. (1998). Oxygen, strontium, and neodymium isotope composition of fossil shark teeth as a proxy for the palaeoceanography and palaeoclimatology of the Miocene northern Alpine Paratethys. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 142(3), 107-121.

Weisrock, D. W., Macey, J. R., Ugurtas, I. H., Larson, A., y Papenfuss, T. J. (2001). Molecular phylogenetics and historical biogeography among salamandrids of the “true” salamander clade: rapid branching of numerous highly divergent lineages in *Mertensiella luschani* associated with the rise of Anatolia. *Molecular phylogenetics and evolution*, 18(3), 434-448.

Wilson EO (1992) *The diversity of life* W. W. Norton y Co., New York.

Zagwijn, W. H. (1992). The beginning of the ice age in Europe and its major subdivisions. *Quaternary Science Reviews*, 11(5), 583-591.

CONCLUSIONES

Nuestros análisis sobre la divergencia genética dentro del género *Pelodytes* demuestran que, en la línea de los resultados anteriores y corroborando la hipótesis inicial de partida de esta tesis, la diversidad en el grupo se encuentra subestimada. Los análisis filogenéticos, basados en un modelo de coalescencia, recuperan cuatro unidades principales y bien soportadas en la rama del género *Pelodytes* que se distribuye en Europa Occidental.

La exploración de la estructura genética sugiere una interrupción histórica del flujo génico que pudo estar en el origen de los fenómenos de especiación. La estructura detectada, desde una aproximación molecular multilocus, es coincidente en el análisis mitocondrial y nuclear de marcadores, y la separación en cuatro clados distintos se confirma en los análisis de validación de especies. La concordancia entre los individuos analizados, tanto desde un punto de vista filogenético como de agrupación bayesiana, es indicativo de la evolución por separado de linajes metapoblacionales independientes. A excepción de un número limitado de individuos pertenecientes a estrechas zonas de contacto localizadas en los límites geográficos de sus distribuciones, los individuos son perfectamente identificables, de forma fiable y sin ambigüedad, a cada uno de los linajes, sea por las secuencias de sus genes nucleares y mitocondriales, sea por los alelos de marcadores nucleares de tasa de evolución rápida. A partir de la información disponible, los clados representan linajes evolutivos independientes y la explicación más plausible es el grado de especie para los cuatro linajes ibéricos.

Nuestros resultados ponen de manifiesto unidades filogeográficas independientes que se corresponden con demarcaciones definidas y que exhiben historias demográficas contrastadas. Los taxa definidos tendrían un ancestro común y estarían delimitados a las siguientes subdivisiones geográficas en la Península Ibérica: *P. ibericus*, Sánchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom & Sanchíz (2000) que se distribuye exclusivamente en el sur, con especies presentes en el sureste de Portugal y suroeste de España; *P. punctatus* que incluye todas las poblaciones al norte de los Pirineos, incluida la localidad tipo de *P. punctatus* "aux alrededores de Beauvais", Departamento Oise, al norte de Francia: Daudin (1802) y estaría formada por dos sublinajes, uno de los cuales se produce desde Cataluña hasta el norte de Francia y un segundo restringido al sur de Francia y norte de Italia; *P. atlanticus* en localidades a lo largo de la costa atlántica y centro de Portugal y *P. hespericus* en la zona centro-levante española, intercalado en los rangos

de distribución de *P. ibericus* y *P. punctatus*.

En consecuencia, la Península Ibérica cuenta con los mayores índices de biodiversidad conocidos hasta la fecha para la familia Pelodytidae, dentro de su rango actual de distribución, con la presencia de tres endemismos, dos de ellos recientemente descritos como especies candidatas y descritas en esta tesis como *P. atlanticus* y *P. hespericus*.

La fuerte correlación entre la variación genética encontrada y la geografía sugieren una historia evolutiva en refugios alopatricos. En base al registro fósil disponible en la actualidad, las edades de divergencia estimadas y los eventos paleogeográficos producidos en el Cuaternario en la Península Ibérica, parece razonable asumir que, al igual que ocurre en otros grupos taxonómicos, las especies se desarrollaron en refugios separados y han permanecido aislados durante largos periodos glaciales. Esta divergencia filogeográfica se ha visto mantenida, en primer lugar, por el tiempo de aislamiento prolongado pero también probablemente por la filopatría de la especie. Los resultados apuntan a un origen Plio-Pleistocénico con edades estimadas en un rango entre hace 2,3 y 3,8 millones de años. Dada la contribución de los episodios de aislamiento a largo plazo durante los sucesivos ciclos glaciales, estos análisis sugieren una colonización ibérica, con la divergencia, en primer lugar de *P. ibericus*, seguida por los linajes de *P. atlanticus*, *P. hespericus* y *P. punctatus*, que cohabitan en la actualidad regiones peninsulares.

Dada la independencia evolutiva de los linajes, se espera que el grado de divergencia entre ellos sea suficiente para manifestar caracteres de diferenciación emergentes y que dichos caracteres secundarios de especiación adquieran una significación en su conjunto. A pesar de la dificultad para encontrar diferencias, el análisis integrado de atributos morfológicos y bioacústicos refleja divergencias interespecíficas y un porcentaje significativo de uniformidad interpoblacional en el género *Pelodytes*, debido probablemente a los aspectos históricos que respaldan las delimitaciones específicas propuestas que apoyan su papel en el fomento de estas divergencias. No obstante, ponen de relieve el carácter críptico del complejo de especies y la necesidad de explorar, desde otras perspectivas, i. e. ecológicas, su estatus actual, determinando la funcionalidad de esta diferenciación.

Nuestra hipótesis sugiere, en primer lugar, una expansión inicial hacia la Península Ibérica en épocas Plio-Pleistocénicas por la presencia de condiciones climáticas adversas en Centroeuropa, seguida

de una diferenciación de las unidades evolutivas en sucesivas etapas y en refugios glaciales separados, y por último, una expansión post-glacial hacia el norte de Europa que continuó hasta época reciente. A pesar de los periodos de relativamente rápida expansión durante periodos interglaciales, se ha mantenido la estructura filogeográfica acumulada probablemente por la existencia de barreras reproductivas que han dificultado la mezcla entre las especies.

Los diferentes linajes muestran historias demográficas distintas. Nuestros datos sugieren que *P. ibericus* y *P. hespericus* han sufrido una expansión reciente en sus rangos de distribución. Por el contrario, la estructura encontrada en las otras dos especies, *P. atlanticus* y *P. punctatus*, concentran regiones con elevados índices de diversidad genética que sugieren núcleos cercanos al centro de divergencia y/o posibles refugios glaciales para estas especies en el límite más suroccidental de su rango actual de distribución.

En *P. atlanticus*, los altos niveles de variabilidad genética que se encuentran claramente desde la región sur hasta la zona de contacto con *P. ibericus*, sugieren que este actual límite de distribución pudo haber constituido un centro cercano al área de refugio en el pasado, un patrón geográfico que presenta notables similitudes con el de otros organismos de distribución atlántica. La rama donde se encuentra el resto de localidades analizadas en la región centro y norte de Portugal presenta un grado de variabilidad considerablemente menor que podría estar indicando diferenciación reciente a partir del sur.

En *P. punctatus* aparecen claramente dos sublinajes diferenciados, coincidentes entre distintos marcadores y correspondientes a dos zonas geográficas concretas: un primer sublinaje presente en la Península Ibérica y ampliamente distribuido desde Cataluña hasta el norte de Francia, y un segundo sublinaje, concentrado en la región sureste de Francia y noreste de Italia. Esta subdivisión en sub-clados, con núcleo de variabilidad en el sur, sugieren la existencia de un corredor a lo largo del río Garona constituiría una ruta de colonización Mediterráneo-Atlántica en época reciente. En las localidades adscritas al primero, existe un mayor grado de variabilidad genética evidente en el límite sur de su distribución. En el segundo sublinaje aparecen niveles considerables de variabilidad genética encontrados en todos los marcadores analizados, y estructura, sugiendo una interrupción histórica del flujo génico.

Tanto la aparición de diferentes clados mitocondriales en las mismas localidades en las que aparecen individuos híbridos para marcadores nucleares, como la discordancia cito-nuclear, pone en evidencia la existencia de contacto secundario entre las cuatro especies. La existencia de dos zonas de contacto secundario a consecuencia de la aparente expansión reciente de *P. ibericus* en el sur de la península Ibérica, da lugar a un escenario diferente según se trate de las especies *P. atlanticus* a oeste, o *P. hespericus* a este, con dos patrones que se comportan de manera marcadamente distinta.

El análisis a escala detallada del contacto secundario reciente entre *P. atlanticus* y *P. ibericus* al suroeste de la distribución, reveló una zona de mezcla donde, a pesar de ser detectado un patrón de introgresión coincidente entre diferentes marcadores, existe una barrera al flujo génico que ha permitido la permanencia de esta zona de contacto hasta el momento presente. La presencia poco frecuente de individuos híbridos para los marcadores nucleares y la ausencia de diferenciación nuclear entre individuos pertenecientes a distintos linajes mitocondriales en la misma localidad, se interpreta como una firma de introgresión que indica que el aislamiento reproductivo no se ha completado. La presencia de clinas coincidentes en el espacio para distintos loci diagnósticos, el desequilibrio gamético, así como la estructura encontrada son la mejor muestra de selección en contra de los híbridos, debida en principalmente a factores genéticos intrínsecos.

El contacto secundario y reciente entre los linajes de *P. hespericus* y *P. ibericus* en el sur de la Península, parece marcado por una profunda huella genética, resultado de una fragmentación histórica anterior en el tiempo y factores de segregación en el hábitat ecológico de las especies con ausencia casi total de introgresión y mezcla. Las diferencias significativas encontradas en la composición del canto en *P. hespericus*, podrían estar en el origen de un posible factor de aislamiento reproductivo pre-cigótico o, en cualquier caso, la diferenciación de un carácter marcadamente ligado al reconocimiento mutuo y la reproducción. La segregación fenológica presente entre las especies puede responder a diferencias en el tipo de hábitat reproductivo, más temporal y efímero en el caso de *P. ibericus* y *P. atlanticus*, que en *P. hespericus*. Por otra parte, la diversificación entre las especies *P. ibericus* y *P. atlanticus*, podría estar relacionada con los patrones de mezcla encontrados en la zona de contacto entre las dos especies; mientras que en la zona de contacto sureste, las relativamente profundas divergencias filogenéticas que en base a nuestras estimas entre los linajes de *P. ibericus* y *P. hespericus*, unido a las características del hábitat, podrían estar en la base de la segregación entre ambos linajes.

CONCLUSIONS

Our analysis of genetic divergence within the genus *Pelodytes* showed that the diversity inside the group is underestimated, in accordance with previous surveys and corroborating the initial hypothesis of this thesis. The phylogenetic analysis, based on a model of coalescence, recovered four main and well-supported units in the branch genus of *Pelodytes* which is distributed in Western Europe.

The exploration of the genetic structure suggests a historical interruption of gene flow that could be in the origin of the speciation phenomena. The structure detected, from a molecular multilocus approach, is consistent in both, mitochondrial and nuclear analysis, and the separation into four distinct clades is confirmed from a species validation approach. Concordant placement of individuals by DNA phylogeny and Structure clustering is an indication for evolutionary independence of metapopulation lineages. Except for a limited number of individuals from their geographical contact zones, the individuals are identifiable, reliably and unambiguously, to each one of the clusters of *Pelodytes*, either by the sequences of their nuclear and mitochondrial genes, whether by microsatellites. We conclude that, considering all available evidences, the clades represent independent evolutionary lineages and the most plausible explanation is the grade of species for the four Iberian lineages.

Our results show independent phylogeographical units, which correspond to defined boundaries, exhibiting contrasting demographic stories. The defined taxa would have a common ancestor and would be delimited in the following geographical subdivisions in the Iberian Peninsula: *P. ibericus*, Sánchez-Herráiz, Barbadillo, Machordom & Sanchiz (2000) distributed exclusively in the southeast of Portugal and the southwest of Spain; *P. punctatus*, which includes all populations in the north of the Pyrenees, including the type locality of *P. punctatus* ("*aux alentours de Beauvais*", Department Oise, north of France: Daudin, 1802) and would be composed of two sub-lineages, one of which is encountered in the region from Catalonia to northern France and a second restricted to southern France and northern Italy; *P. atlanticus*, in localities along the Atlantic coast and central Portugal, and *P. hespericus* in the Spanish centre-lift, inserted in the distribution ranges of *P. ibericus* and *P. punctatus*.

Consequently, the Iberian Peninsula has the highest rates of biodiversity known to date for the Pelodytidae family, within its current distribution range, with the presence of three endemic species, two of them recently described as candidate species and described in this thesis as *P. atlanticus* and *P. hespericus*.

The strong correlation between genetic variation and geography suggests an evolutionary history in allopatric refuges. Based on fossil records available, the estimated ages of divergence among clades and paleogeographic events produced in the Quaternary in the Iberian Peninsula, it seems reasonable to assume that, as it occurs in other taxonomic groups, the species developed in separate refugia, remaining isolated for long glacial periods. This phylogeographic divergence has been maintained by the prolonged isolation but also probably by filopatry of the species. The phylogenetic results indicate a Plio-Pleistocene origin recovered ages between 2.3–3.8 mya for the splits among the four lineages. Given the contribution of the episodes of long-term isolation during successive glacial cycles, these analyses suggest an Iberian colonization with a Plio-Pleistocene differentiation, with the first divergence *P. ibericus*, followed by lineages of *P. atlanticus*, *P. hespericus* and *P. punctatus*, current distributed in Iberian Peninsula.

Given the evolutionary independence of the lineages, it is expected that the degree of divergence between them is sufficient to show characters of emerging differentiation and these secondary speciation attributes acquire significance as a whole. Despite the difficulty to found differences, the integrated analysis of bioacustical and morphological attributes of the populations reflects interspecific differences and a significant percentage of interpopulational uniformity of the genus *Pelodytes*, probably due to the historical aspects that support the proposed specific boundaries and support its role in promoting these differences. However, they highlight the cryptic character of species complex and the need to explore, from different perspectives, *e.g.*, ecological, the current status, determining the functionality of the differentiation.

Our hypothesis suggests, first, an initial expansion into the Iberian Peninsula in Plio-Pleistocene times followed by a differentiation of the evolutionary units in successive stages and separated glacial refugia, and last, a post-glacial expansion into northern Europe that continued until recently. Despite the periods of relatively rapid expansion during the interglacial periods, it has maintained the phylogeographic structure accumulated by the existence of reproductive barriers that have hindered the admixture between the different species.

The different lineages show different demographic histories. Our data suggest a recent expansion in the distribution ranges of *P. ibericus* and *P. hespericus*. By contrast, the structure found in the other two species, *P. atlanticus* and *P. punctatus*, concentrate regions with high levels of genetic diversity that suggest areas near the centre of divergence and/or possible glacial refuges for these species in southwestern limit of the current distribution ranges.

Within *P. atlanticus*, the high levels of genetic variability that are clearly from the south region to the zone of contact with *P. ibericus*, suggest that this distribution limit could have been close to the centre of the refuge area in the past, a geographical pattern that has remarkable similarities with other organisms of Atlantic distribution. In the branch of central and northern region of Portugal, the variability degree is considerably lower, so it could indicate a recent differentiation from the south.

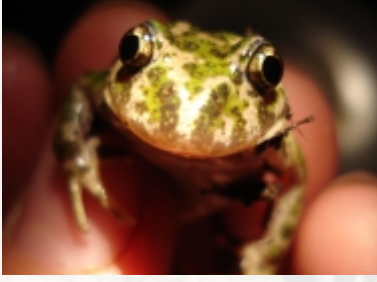
In *P. punctatus* appear clearly two different sublineages, coincident through different markers and corresponding to specific concrete geographic areas: first one present in the Iberian Peninsula and widely distributed from Catalonia to northern France, and a second one concentrated in the south-eastern France and north-eastern Italy. These sub-clades, with a centre of variability in the south, suggest the existence of a corridor along the Garonne River, which would be a route of Mediterranean-Atlantic colonization in recent times. In the localities assigned to the first, there is a clear higher degree of genetic variability in the southern edge of its distribution range. The second sublineages show considerable levels of genetic variability, found in all analysed markers, and structure suggesting a historic interruption of the gene flow.

The appearance of different mitochondrial clades in the same localities in which hybrid individuals appear for nuclear markers, such as cyto-nuclear discordance, demonstrate the existence of secondary contact among the four species. The existence of two zones of secondary contact as a result of the apparent recent expansion of *P. ibericus* in the south of the Iberian Peninsula, gives rise to a contact zone scenario with two patterns completely different depending on whether the species *P. atlanticus* to west, or *P. hespericus* to east.

The analysis, considering a detailed scale, of the recent secondary contact between *P. atlanticus* and *P. ibericus* in the southwest of the distribution range, revealed a mixing zone with a barrier to gene flow that has allowed the continuance of this contact zone until the present moment. The rare presence, in the same locality, of hybrid individuals for nuclear markers and the absence of nuclear differentiation among individuals from different mitochondrial lineages, is interpreted as a sign of introgression indicating that reproductive isolation is not complete. The presence of coincident clines in the space for different diagnostic loci, the linkage disequilibrium and structure found, show selection against the hybrids mainly due to intrinsic genetic than abiotic factors.

The secondary and recent contact among the lineages of *P. ibericus* and *P. hespericus* in the south of the Peninsula seems to be marked by a deep genetic fingerprint, resulted from a previous historical

fragmentation and segregation factors in the ecological habitat of the species with almost total absence of introgression and mixture. The significant differences found in the composition of song in *P. hespericus*, could be in the source of a possible pre-zygotic reproductive isolation factor or, in any case, the differentiation of a character strong linked to the mutual recognition and the reproduction. The phenological segregation could respond to differences in the type of breeding habitat, more temporary and ephemeral in the case of *P. ibericus* and *P. atlanticus* than in *P. hespericus*. The diversification between the species *P. ibericus* and *P. atlanticus* could be related to the mixing patterns found in the area of contact between these two species; while in the southeast contact area, the relatively deep phylogenetic divergences that, based on our estimates, seems to be between the lineages of *P. hespericus* and *P. ibericus*, coupled with the habitat characteristics, could be on the basis of the segregation between both lineages.



HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS SAPILLOS MOTEADOS (*Pelodytes spp.*) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA:

Filogenia, filogeografía y patrones de genética de poblaciones inferidos a partir de la variación en el ADN mitocondrial, nuclear y microsatélites

Tesis Doctoral

Francisco Jesús Díaz Rodríguez

