TESIS DOCTORAL

**BIOGEOGRAFÍA Y ECOLOGÍA DE LAS
VÍBORAS IBÉRICAS (*Vipera aspis*, *V. latastei* y
V. seoanei) EN UNA ZONA DE CONTACTO
EN EL NORTE PENINSULAR**

**BIOGEOGRAPHY AND ECOLOGY OF THE IBERIAN
VIPERS (*Vipera aspis*, *V. latastei*, *V. seoanei*) IN A CONTACT
ZONE IN NORTHERN IBERIAN PENINSULA**

FERNANDO MARTÍNEZ FREIRÍA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA

**BIOGEOGRAFÍA Y ECOLOGÍA DE LAS VÍBORAS
IBÉRICAS (*Vipera aspis*, *V. latastei* y *V. seoanei*) EN UNA
ZONA DE CONTACTO EN EL NORTE PENINSULAR**

**BIOGEOGRAPHY AND ECOLOGY OF THE IBERIAN
VIPERS (*Vipera aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei*) IN A CONTACT
ZONE IN NORTHERN IBERIAN PENINSULA**

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología por la
Universidad de Salamanca, presentada por

Fernando Martínez Freiría

Fdo. Fernando Martínez Freiría

Salamanca, 2009

NOTAS PREVIAS

Para la realización de esta tesis doctoral he sido beneficiario durante cuatro años, desde febrero de 2004 hasta enero de 2008, de una beca pre-doctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte (referencia AF 2633-2003).

En la elaboración de esta memoria de tesis doctoral se han utilizado varios artículos publicados en revistas científicas y, por ello, esta memoria presenta capítulos en lengua inglesa y otras partes en lengua castellana. En cumplimiento del acuerdo adoptado por la Comisión de Doctorado y Posgrado de la Universidad de Salamanca, por el que se permite la presentación de la memoria de tesis doctoral en dos idiomas, adjunto un resumen en castellano, antes de cada capítulo en lengua inglesa.

Esta tesis doctoral deberá ser citada como:

Martínez-Freiría, F. (2009). *Biogeografía y ecología de las víboras ibéricas (Vipera aspis, V. latastei y V. seoanei) en una zona de contacto en el Norte peninsular*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. 341 pp.

This PhD thesis should be cited as:

Martínez-Freiría, F. (2009). *Biogeografía y ecología de las víboras ibéricas (Vipera aspis, V. latastei y V. seoanei) en una zona de contacto en el Norte peninsular*. PhD Thesis. Universidad de Salamanca. 341 pp.

Fotos: Fernando Martínez Freiría.

Dibujos: Adrián Lamosa Torres.

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Art. 10a, cap. 2, R.D. 56/2005

El Dr. Miguel Lizana Avia y el Dr. José C. Brito como directores de la Tesis Doctoral titulada “BIOGEOGRAFÍA Y ECOLOGÍA DE LAS VÍBORAS IBÉRICAS (*V. aspis*, *V. latastei* y *V. seoanei*) EN UNA ZONA DE CONTACTO EN EL NORTE PENINSULAR” realizada por D. Fernando Martínez Freiría en el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca, informan favorablemente en el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo firmamos, para dar cumplimiento al Art. 10a, cap. 2 del R.D. 56/2005.

Fdo. Miguel Lizana Avia

Fdo. José C. Brito

Salamanca, 30 de julio de 2009.

Vairão, 29 de julio de 2009

A mi familia

"Choose life. Choose a job. Choose a career. Choose a family. Choose a fucking big television. Choose washing machines, cars, compact disc players and electrical tin openers. Choose good health, low cholesterol, and dental insurance. Choose fixed interest mortgage repayments. Choose a starter home. Choose your friends. Choose leisurewear and matching fabrics. Choose DIY and wondering who the fuck you are on a Sunday morning. Choose sitting on that couch watching mind-numbing, spirit crushing game shows, stuffing junk food into your mouth. Choose rotting away at the end of it all, pishing your last in a miserable home, nothing more than an embarrassment to the selfish, fucked up brats you spawned to replace yourself.

Choose a future.

Choose life..."

John Hodge, 1996

Trainspotting

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Resumen	iii
Abstract	v
Resumo	vii
 INTRODUCCIÓN	 1
I.1 Especiación	3
I.2 Competencia Interespecífica y Segregación de Nicho	14
I.3 Especiación durante el Cuaternario	17
I.4 La Familia Viperidae	24
 ÁREA DE ESTUDIO	 43
 OBJETIVOS	 53
 CAPÍTULO 1. Caracterización biológica de las víboras ibéricas	 75
1.1 Víbora áspid - <i>Vipera aspis</i>	79
1.2 Víbora hocicuda - <i>Vipera latastei</i>	90
1.3 Víbora de Seoane - <i>Vipera seoanei</i>	102
 CAPÍTULO 2. Formas intermedias y sintopía	 125
Formas intermedias y sintopía entre víboras (<i>Vipera aspis</i> y <i>V. latastei</i>) en el Norte de la península Ibérica	 129
Intermediate forms and syntopy among vipers (<i>Vipera aspis</i> and <i>V. latastei</i>) in Northern Iberian Peninsula	 131
 CAPÍTULO 3. Modelación de la distribución y los hábitats	 137
Modelos de nicho basados en SIG identifican correlaciones ambientales sustentando una zona de contacto entre tres especies de víboras europeas	 141
GIS-based niche models identify environmental correlates sustaining a contact zone between three species of European vipers	 147

CAPÍTULO 4. Patrones geográficos de variación morfológica	163
Patrones geográficos de variación morfológica y correlaciones ambientales en las zonas de contacto: una aproximación multi-scalar usando dos víboras mediterráneas (Serpentes)	167
Geographical patterns of morphological variation and environmental correlates in contact zones: a multi-scale approach using two Mediterranean vipers (Serpentes)	173
CAPÍTULO 5. Rasgos ecológicos	201
Ofidiofagia y canibalismo en <i>Vipera latastei</i> Boscá, 1978 (Reptilia, Viperidae)	205
Ophiophagy and cannibalism in <i>Vipera latastei</i> Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae)	207
Comparación de los rasgos ecológicos de dos víboras mediterráneas en una zona híbrida: competencia interespecífica, segregación de nicho y ventajas competitivas	213
Comparative ecological traits of two Mediterranean vipers in a hybrid zone: interspecific competition, niche segregation, and competitive advantages	221
CAPÍTULO 6. Termorregulación	249
Termorregulación de las víboras mediterráneas en una zona híbrida en el norte de la península Ibérica	253
Thermoregulation of Mediterranean vipers in a hybrid zone in Northern Iberian Peninsula	259
CAPÍTULO 7. Variación genética y zona híbrida	277
Una aproximación híbrida a la hibridación: la aplicación de herramientas moleculares, geo-estadísticas y SIG al estudio de una zona de contacto entre tres víboras ibéricas	281
Hybrid approach to hybridization: the application of molecular, geostatistical and GIS tools to the study of a contact zone between three Iberian vipers	289
CONCLUSIONES	309
Conclusiones	311
Conclusions	317

Agradecimientos

Por fin, aquí está... ¡yuuuu! Aquí está la memoria de mi tesis doctoral. Fruto de cinco años y medio de trabajo, en los que he invertido muchas horas de campo y otras muchas delante del ordenador. Cinco años y pico de momentos buenísimos y divertidos, experiencias inolvidables y, también, muchas atrapadas... Un paso más en esta carrera de obstáculos, que no habría sido posible sin el apoyo y la colaboración de todos vosotros... ¡¡muchas gracias!!

Miguel Lizana, ha sido mi director de tesis. Me invitó a hacer el curso de doctorado en Salamanca, allá por finales del año 2002. Creyó en mi proyecto y en mi manía de estudiar las víboras ibéricas. Me facilitó la tarea de pedir una beca pre-doctoral y, más tarde, cuando me la concedieron, me dio plena libertad para poder desarrollar el trabajo de campo en la Hoces del Ebro. Desde entonces ha estado siempre ahí como un amigo para solucionarme un poquito la vida... ¡Gracias Miguel!

José Carlos Brito me invitó a ver como trabajaba con víboras en el P.N. da Peneda-Gerês en Portugal. Aquello ocurrió en la primavera del 2003 y desde entonces ha colaborado conmigo en todo, no sólo como director de tesis sino que también como un gran amigo. Una vez me establecí en las Hoces, vino muchas veces a ayudarme con el trabajo de campo, la elaboración de presentaciones a congresos, la revisión de manuscritos,... etc. Consiguió el financiamiento necesario para analizar las muestras genéticas y realizar el estudio de termorregulación, todo ello por medio de proyectos de la FCT. Me ayudó en mis estancias en Vairão, invitándome a vivir en su casa durante la primera de ellas y ayudándome a encontrar la casa de Mindelo en la segunda. Me ha enseñado prácticamente todo lo que sé acerca de SIG y mucho sobre análisis de datos. Tantas cosas... que sería muy difícil relatarlas todas. Finalmente no estaba todo tan fodido... ¡¡Obrigado Zé Carlos!!

Mi familia: mis abuelos, mis padres y mi hermana. Siempre han estado ahí, apoyándome. Han creído en mí y me han facilitado mucho el trabajo. Me visitaron varias veces en las Hoces y me proporcionaron un ambiente tranquilo, pese a mis continuas rabietas y declaraciones de que la casa era un sin vivir, a mi regreso a Tui, cada invierno y una vez finalizada la beca. Todo esto y mucho más... ¡muchas gracias a los cinco!

Luci, consiguió que mi vida fuera más fácil y divertida. Vino en incontables ocasiones a las Hoces, me ayudó muchísimo con el trabajo de campo y estuvo ahí, apoyándome, en momentos muy duros. ¡Gracias Luci!

Mis amigos de Tui y alrededores del Baixo Miño: Aidis, Víctor, Xose, Aida, Iago, Mígui, Uxi, Zalo, Pelu, Miguel, Montse, Pavi, Pitu, Sandra... (seguro que se me queda alguno atrás) que me han visitado varias veces en las Hoces, colaborando conmigo en el trabajo de campo y a los que les debo muchos de los mejores momentos de mi vida allí. ¡Moitas grazas!

Mis amigos de la facultad de Santiago: Xosé, Patri, Adrián, Víctor, Jarsé, Pacis, Marcial, Martiño... me visitaron en las Hoces y me ayudaron con el trabajo de campo. Xosé y Adri se ocuparon de los muestreos de micromamíferos, han revisado muchos de los textos de esta tesis... y me han apoyado mucho. Xosé ha aturado mis quebraderos de cabeza y Adri ha realizado los dibujos de esta tesis... ¡Moitas grazas!

María, me ha ayudado durante una fase muy importante de la elaboración de esta tesis y alguna publicación, así como durante varias comunicaciones para un congreso. ¡Gracias María!

Alfonso y Mari, y su familia, mis caseros y amigos en el Barrio de Nápoles. Me acogieron desde el primer día con mucho cariño y me ayudaron mucho en mi estancia en las Hoces. ¡Gracias!

Nacho, una de las personas que mejor conoce y más quiere las Hoces del Alto Ebro. Con él he pasado muchas horas de muestreo en el campo, muchas vivencias y momentos inolvidables. Me ha ayudado y apoyado muchísimo, tanto en el trabajo de campo como en otros aspectos más sociales... ¡Gracias Nachete!

Santi, Ana, Santi... y tantos otros de Valdelateja y de la “Asociación Hoces del Alto Ebro y Rudrón” por haberme ayudado y apoyado durante el trabajo de campo. Santi, además, me ayudó en mi empeño del estudio de las víboras en semi-cautividad, proporcionándome un lugar para hacerlo. ¡Muchas gracias!

La guardería de las Hoces, que nunca han interferido en mis investigaciones y me han defendido ante las acusaciones de aquellos menos agraciados mentalmente. ¡Gracias!

Nefta, amigo y co-autor de la publicación sobre modelación de la distribución y hábitats. Compañero de congresos y batallas en Marruecos, Túnez y Mauritania, me ha ayudado mucho en la redacción de la tesis, revisando y señalándome muchos errores, gazapos para él... ¡Gracias Nef!

Xavi y Plegue, amigos y co-autores en la publicación de variación morfológica. Además, me han ayudado, revisado y aconsejado en otras publicaciones. ¡Gracias a los dos!

Zé Pedro, co-autor en los artículos de los rasgos ecológicos y termorregulación; implantó los radio-transmisores a las víboras y realizó los experimentos de termorregulación con la ayuda de Clara, Hélder, Nuno, Isa y Joana. ¡Obrigado!

Pedro Tarroso, co-autor en el artículo de la zona híbrida, del que ha realizado la mayoría de los análisis, además de un buen amigo y compañero de aventuras en Mauritania. ¡Obrigado Perico!

Miguel A. Carretero, amigo y revisor de alguno de los manuscritos que conforman esta tesis. Además, me ha ayudado en mis estancias en Vairão y siempre que lo he necesitado. ¡Gracias Miguel!

Xavier Parellada, me aconsejó como montar los terrarios de semi-cautividad. ¡Gracias!

Mis compañeros de departamento en Salamanca: Vanessa, Manu, María José y Víctor, por ayudarme con los papeleos de la beca y tesis y acogerme tan bien cada vez que me pasaba por Salamanca. ¡Muchas gracias!

Y si de papeleos se trata... ¡quién mejor que Teresa! Sobrada conocedora de los entresijos burocráticos de la Universidad de Salamanca, me ha facilitado tanto las gestiones académicas que si no fuera por ella creo que aún estaría inscribiéndome ahora mismo en el curso de doctorado. ¡Muchas gracias Teresa!

Mis colegas del CIBIO: Antigoni, Chico, Raquel, Hugo, Ana... (y todos los que se me quedan atrás, que son muchos) por vuestra grata acogida en mis dos estancias y cada vez que me he pasado por Vairão. ¡Obrigado!

Benny y Klaus, aparecieron un día por Covanera para fotografiar anfibios y reptiles. Con ellos capturé alguna víbora y pasé muy buenos momentos. Benny volvió al año siguiente, cocinó varias veces patatas con huevos revueltos (riquísimas) y me ayudó capturando tres víboras de Seoane. ¡Danke a los dos!

Los conservadores de las instituciones que visité para medir víboras de sus colecciones: Alberto Gosá de la Sociedad de Ciencias Aranzadi de Donostia, José E. González del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, Eulàlia García del Museu de Ciències Naturals de Barcelona, Gustavo A. Llorente del Departament de Biologia Animal de la Universitat de Barcelona y César Pedrocchi del Instituto Pirenaico de Ecología de Jaca.

Rubén, María, Diego y Esther por acogerme en sus casas cada vez que he tenido que ir a Madrid y Barcelona a ver colecciones y otras cosas. ¡Graciñas!

Aquellos que me han amargado la vida durante mi estancia en las Hoces; esos cortos de mente arraigados a miedos ancestrales y politiqueos caciquiles que me han acusado de soltar víboras en sus pueblos y han destrozado los terrarios de semi-cautividad; esos ineptos que me han amenazado y han tratado de abucharme en repetidas ocasiones. A vosotros también gracias, porque lo que no te mata... ¡Te hace más fuerte!

Y, finalmente... gracias a todos los bichos a los que he molestado en el campo, todos aquellos que se han dejado capturar y manosear, algunos de manera más fácil que otra, a todos aquellos que he interrumpido durante momentos cruciales de su vida y a todos aquellos que, sin quererlo, he dañado.

RESUMEN

Las zonas de contacto secundario entre especies filogenéticamente cercanas han recibido mucha atención durante las últimas décadas por parte de la comunidad científica. En muchos casos, en estas zonas de contacto se dan fenómenos de hibridación e intercambio genético, por lo que su estudio ha sido referido como una importante herramienta en la comprensión de los procesos de especiación que son responsables de los patrones de biodiversidad actual.

Las víboras europeas (Reptilia, Viperidae) constituyen un grupo monofilético diversificado a través de procesos de especiación alopátrica durante el Plioceno y Pleistoceno. En la Península Ibérica existen tres especies de víboras, dos especies cercanas filogenéticamente y de origen mediterráneo (clado *aspis*), *Vipera aspis* y *V. latastei*, y otra especie más alejada filogenéticamente y de origen euro-siberiano (clado *berus*), *V. seoanei*. La distribución de las tres especies es parapátrica pero existen zonas de contacto donde se ha sugerido una distribución simpátrica y, en algunas de ellas, se han encontrado ejemplares con características morfológicas intermedias entre las especies.

La única zona conocida donde contactan las distribuciones de las tres especies ocurre en el Alto curso del río Ebro (Alto Ebro), en el Norte de España. Se trata de una zona de transición entre las regiones bioclimáticas Euro-siberiana y Mediterránea, lo que se traduce en una zona de transición gradual de condiciones climáticas como la precipitación y la temperatura.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido estudiar la influencia de los factores ambientales y ecológicos en el mantenimiento de las zonas de contacto secundario entre especies alopátricas, usando como modelo las tres especies de víboras ibéricas en la zona de contacto del Alto Ebro.

Para ello se estudió específicamente la distribución a escala local, la selección de hábitats y la variación en la frecuencia de alelos de las tres especies; la variación geográfica en la morfología y su relación con los factores ambientales, los rasgos ecológicos y termorregulativos de las especies en coexistencia, bajo los escenarios de especiación alopátrica y competencia interespecífica.

El trabajo de campo se llevó a cabo desde marzo de 2004 hasta octubre de 2007 y en él se desarrollaron diferentes metodologías como muestreos en base a cuadrículas UTM 1x1 km, recorridos en coche, recorridos estandarizados, experimentos de mantenimiento en cautividad de hembras reproductoras, monitorización de ejemplares con técnicas de radio-telemetría y experimentos de termorregulación. Para el tratamiento de los datos de campo se han utilizado técnicas como los SIG, la modelación del nicho ecológico, análisis geo-estadísticos y otros análisis estadísticos más convencionales.

Los resultados obtenidos permiten la identificación de una serie de mecanismos ecológicos, relacionados con la diferente historia evolutiva y requerimientos fisiológicos, que llevan al aisla-

miento reproductor y explican la distribución de las tres especies en el Alto Ebro.

A escala local las tres especies se distribuyen de manera alopátrica, pero el par cercano filogenéticamente *aspis-latastei* superpone su distribución en un área de simpatría localizada en el curso medio de los ríos Rudrón y Sedanillo, donde se han encontrado especímenes con morfología intermedia entre ambas especies. Esta área de transición medioambiental se reconoce como una zona de integración morfológica donde existe un patrón Norte-Sur de convergencia en la variabilidad morfológica de *V. aspis* y *V. latastei* correlacionado con variables climáticas. Análisis de variación genética de los microsátélites de varios especímenes del Alto Ebro han revelado la existencia de flujo genético entre ambas especies y que la mayoría de los ejemplares con morfología intermedia son híbridos entre *V. aspis* y *V. latastei*. Los híbridos y las especies parentales tienen nichos ecológicos similares, por lo que el área potencial de distribución de los primeros se solapa en un 50% con el área de simpatría de los segundos.

Análisis comparativos de los rasgos ecológicos de las dos especies y los híbridos sugieren un escenario de elevada competencia interespecífica y la ocurrencia de segregación espacial y temporal como mecanismos para permitir la coexistencia entre las tres formas. Sin embargo, el uso diferencial de los recursos parece conferir ventajas reproductivas y demográficas a *V. latastei* y los híbridos, respectivamente. Además, la eficacia reproductora de la población híbrida es intermedia entre las poblaciones de especies parentales lo que sugiere la ocurrencia de selección endógena.

Análisis comparativos de los rasgos termorregulativos señalaron diferencias térmicas en la selección de hábitats y las capacidades termorregulativas de las hembras de *V. aspis*, *V. latastei* e híbridos en el área de simpatría. Este área es identificada como una zona de transición de las condiciones térmicas, demasiado cálida para *V. aspis* y demasiado fría para *V. latastei*. Los híbridos son más termófilos y usan hábitats intermedios entre las especies parentales, lo que constituye una ventaja para ellos. Esto parece llevar a un mejor desenvolvimiento ecológico de los híbridos en el área de simpatría y parece causar las desventajas reproductivas y demográficas de *V. aspis* y *V. latastei*, respectivamente.

La zona de simpatría se ajusta a un modelo de zona híbrida de tensión, en la que los híbridos, pese a tener una eficacia reproductiva intermedia entre *V. aspis* y *V. latastei*, se desenvuelven mejor que las especies parentales en la zona de transición ambiental pero no fuera de ésta. Por lo tanto, las características de ecotono de la zona híbrida crean una barrera para la dispersión y el intercambio genético de las dos especies.

Este estudio contribuye a un mejor conocimiento de las relaciones ambientales y ecológicas entre las especies alopátricas en las zonas de contacto secundario. Además, aporta nueva información, sobre la biología general de las víboras ibéricas.

ABSTRACT

Secondary contact zones among closely related species have received much attention from the scientific community during the past decades. Usually, hybridization and gene flow processes occur in these contact zones, thus, their study has been identified as an important tool for the understanding of speciation processes which are responsible for current biodiversity patterns.

European vipers (Reptilia, Viperidae) constitute a monophyletic group which evolved through an allopatric speciation process during Pliocene and Pleistocene periods. In the Iberian Peninsula there are three species, two closely related Mediterranean (*aspis* clade), *Vipera aspis* and *V. latastei*, and another Eurosiberian more phylogenetically distant (*berus* clade), *V. seoanei*. Their distributional ranges are parapatric but with contact zones where a sympatric distribution was suggested and, in some of them, intermediate morphological specimens were found.

The only known contact zone among the three species occurs in the High course of Ebro river (High Ebro), in northern Spain. This area consists of a transitional zone among Eurosiberian and Mediterranean bioclimatic regions, with a gradual environmental transition zone in precipitation and temperature.

The major aim of this Doctoral Thesis was studying the influence of environmental and ecological factors in the sustaining of contact zone among allopatric species, using the three Iberian vipers in the High Ebro contact zone as a model.

For this reason, it was specifically studied the distribution at local scale, habitat selection and variation in the allele's frequency of the three species; the geographic variation in morphology and its relation to environment, ecological and thermoregulatory traits of species in coexistence, under the scenarios of allopatric speciation and interspecific competition.

Field work was carried out from March 2004 to October 2007 and consisted of a combination of different methodologies, including visual and road encounter surveys based on UTM 1x1 squares, standardized surveys, maintenance in captivity of pregnant females, monitoring of specimens with radio-tracking techniques and thermoregulation experiments. Data was analysed with Geographical Information Systems (GIS), ecological niche-based modelling, geostatistics and other conventional statistical analyses.

Results allow the identification of ecological mechanisms, related to differences in evolutionary history and physiological requirements, which lead to reproductive isolation and explain the distribution of the three species in the High Ebro.

An allopatric distribution pattern at local scale was found for the three species, but closely-related *aspis-latastei* overlap in sympatry in the middle course of the rivers Rudrón and Sedanillo,

where specimens with intermediate morphological characteristics have been found. This transitional environmental area was recognized as a morphological integration zone where a convergent north-south pattern in morphological variability of *V. aspis* and *V. latastei* was correlated with environmental variables. Analyses of microsatellite variation in specimens from High Ebro revealed the existence of gene flow among both species and that morphologically intermediate vipers correspond mostly to hybrids among *V. aspis* and *V. latastei*. Hybrids and parental species have similar niches, thus the potential area of occurrence for the first overlap with a 50% of the sympatry area for the latter.

Comparative analyses of ecological traits of the two species and hybrids suggest a scenario of high interspecific competition and the occurrence of spatial and temporal segregation for allowing coexistence among the three forms. However, differential use of resources seems to be conferring reproductive and demographic advantages for *V. latastei* and hybrids, respectively. Moreover, reproductive fitness of hybrid population is intermediate among parental species which suggests the occurrence of endogenous selection.

Comparative analyses of thermoregulative traits found different thermal habitat selection and capacities for *V. aspis*, *V. latastei* and hybrid females in the sympatry area. The area is identified as a transition of thermal conditions, too warm for *V. aspis* and too cool for *V. latastei*. Hybrids are more thermophilic and use intermediate thermal habitats than parental species, which constitutes an advantage for them. It seems to be related to a better performance of hybrids than parental species in the sympatry area and to be the cause of the reproductive and demographic disadvantages for *V. aspis* and *V. latastei*, respectively.

The sympatry area fits a hybrid tension-zone model: hybrids, despite of having intermediate reproductive fitness between *V. aspis* and *V. latastei*, they are more abundant and have lower mortality than parental species in the transitional environmental zone, but not out of it. Therefore, the ecotone characteristics of the hybrid zone create a barrier to dispersal and gene flow between Mediterranean species.

This study contributes to a better understanding of environmental and ecological factors influencing the range of allopatric species in secondary contact zones. Moreover, it provide new information about the general biology of Iberian vipers.

RESUMO

As zonas de contacto secundario entre especies próximas filoxenéticamente recibiron moita atención durante as últimas décadas por parte da comunidade científica. En moitos casos, nestas zonas de contacto danse fenómenos de hibridación e intercambio xenético, polo que o seu estudio foi referido como unha importante ferramenta na comprensión dos procesos de especiación que son responsables dos patróns de biodiversidade actuais.

As víboras europeas (Reptilia, Viperidae) constitúen un grupo monofilético diversificado a través de procesos de especiación alopátrica durante o Plioceno e Pleistoceno. Na península Ibérica existen tres especies de víboras, dúas especies cercanas filoxenéticamente e de orixe mediterráneo (clado *aspis*), *Vipera aspis* e *V. latastei*, e outra especie máis alonxada filoxenéticamente e de orixe euro-siberiano (clado *berus*), *V. seoanei*. A distribución das tres especies é parapátrica pero existen zonas de contacto onde foi suxerida unha distribución simpátrica e, nalgunas delas, foron atopados exemplares con características morfolóxicas intermedias entre as especies en contacto.

A única zona coñecida onde contactan as distribucións das tres especies ocorre no Alto curso do río Ebro (Alto Ebro), no Norte de España. Trátase dunha zona de transición entre as rexións bioclimáticas Euro-siberiana e Mediterránea, o que se traduce nunha zona de transición gradual de condicións climáticas como a precipitación e a temperatura.

O obxectivo principal desta tesis doctoral foi o de estudar a influencia dos factores ambientais e ecolóxicos no mantemento das zonas de contacto secundario entre especies alopátricas, utilizando como modelo as tres especies de víboras ibéricas na zona de contacto do Alto Ebro.

Para isto estudiouse especificamente a distribución a escala local, a selección de hábitats e a variación na frecuencia de alelos das tres especies; a variación xeográfica na morfoloxía e a súa relación cos factores ambientais, os rasgos ecolóxicos e termorregulativos das especies en coexistencia, baixo os escenarios de especiación alopátrica e competencia interespecífica.

O traballo de campo realizouse desde marzo de 2004 ata outubro de 2007 e nel se desenvolveron diferentes metodoloxías coma amostraxes en base a cuadrículas UTM 1x1 km, recorridos en coche, recorridos estandarizados, experimentos de mantemento en cautividade de femias reproductoras, monitorización de exemplares con técnicas de radio-telemetría e experimentos de termorregulación. Para o tratamento dos datos de campo se utilizaron técnicas como os SIX, a modelación do nicho ecolóxico, análises xeo-estadísticos e outras análises estadísticas máis convencionais.

Os resultados obtidos permiten a identificación dunha serie de mecanismos ecolóxicos,

relacionados coa diferente historia evolutiva e necesidades fisiolóxicas, que levan ao illamento reproductor e explican a distribución das tres especies no Alto Ebro.

A escala local as tres especies se distribúen de maneira alopátrica, pero o par mediterráneo (*aspis-latastei*) superpón a súa distribución nun área de simpatría localizada no curso medio dos ríos Rudrón e Sedanillo, onde se atoparon espécimes con morfoloxía intermedia entre ámbalas dúas especies. Esta área de transición medioambiental é recoñecida como unha zona de integración morfolóxica onde existe un patrón Norte-Sur de converxencia na variabilidade morfolóxica de *V. aspis* e *V. latastei* correlacionado con variabeis climáticas. Análisis de variación xenética dos microsátélites de varios espécimes do Alto Ebro revelaron a existencia de fluxo xenético entre ambas especies e que a maioría dos exemplares con morfoloxía intermedia son híbridos entre *V. aspis* e *V. latastei*. Os híbridos e as especies parentais teñen nichos ecolóxicos similares, polo que a área potencial de distribución dos primeiros sobreponse nun 50% coa área de simpatría dos segundos.

Análisis comparativos dos rasgos ecolóxicos das dúas especies e os híbridos suxiren un escenario de elevada competencia interespecífica e a ocorrencia de segregación espacial e temporal como mecanismos para permitir a coexistencia entre as tres formas. Nembargantes, o uso diferencial dos recursos parece conferir vantaxes reproductivas e demográficas a *V. latastei* e aos híbridos, respectivamente. Ademáis, a eficacia reproductora da poboación híbrida é intermedia entre a das especies parentais, o que suxire a ocorrencia de selección endóxena.

Análisis comparativos dos rasgos termorregulativos sinalaron diferencias térmicas na selección de hábitats e as capacidades das femias de *V. aspis*, *V. latastei* e híbridos na área de simpatría. Esta área se identifica como unha zona de transición das condicións térmicas, demasiado cálida para *V. aspis* e demasiado fría para *V. latastei*. Os híbridos son máis termófilos e seleccionan os hábitats intermedios entre as especies parentais, o que constitúe unha vantaxe para eles. Isto parece estar relacionado cun mellor desenvolvemento ecolóxico dos híbridos na área de simpatría e parece causar as desvantaxes reproductivas e demográficas de *V. aspis* e *V. latastei*, respectivamente.

A zona de simpatría se axusta a un modelo de zona híbrida de tensión, na que os híbridos, aínda que teñen unha eficacia reproductiva intermedia entre *V. aspis* e *V. latastei*, se desenvolven mellor que as especies parentais na zona de transición ambiental pero non fora desta. Polo tanto, as características de ecotono da zona híbrida crean unha barreira para a dispersión e o intercambio xenético das dúas especies.

Este estudo contribúe a un mellor coñecemento das relacións ambientais e ecolóxicas entre as especies alopátricas nas zonas de contacto secundario. Ademáis, aporta nova información sobre a bioloxía xeral das víboras ibéricas.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCTION

1. ESPECIACIÓN

La especiación es el proceso de formación de nuevas especies (Hollocher, 2000). Es la principal fuente de biodiversidad en el planeta; un proceso que ocurre cuando el intercambio genético entre poblaciones hermanas se reduce lo suficiente como para permitir que cada una siga líneas evolutivas diferentes (Bush, 2001). Es un proceso de magnitud asombrosa, sobre todo cuando consideramos que todas las especies de plantas verdes comparten un ancestro común en una simple alga que vivió hace unos 500 millones de años, que todos los vertebrados descienden de un antiguo cordado, o que millones de especies de insectos han evolucionado durante los últimos 400 millones de años a partir de un primer antepasado que colonizó la tierra (Brown & Lomolino, 1998).

1.1 Especiación y los conceptos de especies

Tras la sencilla definición de la especiación como el proceso originador de especies está el hecho de que este proceso es casi tan complejo y variado como la diversidad por sí misma (Hollocher, 2000). Pero para entender cómo se origina la biodiversidad, es decir, cómo se produce la especiación, primero hay que diferenciar qué es una especie. Aunque el concepto de especie es algo básico en biología, no existe consenso en su definición. De hecho, durante el siglo pasado se han desarrollado varias definiciones de especie (Tabla 1) y en la actualidad no existe una sencilla definición universalmente aceptada (Cracraft, 2000; Hollocher, 2000; Hey, 2001, 2006; Perfectti, 2003).

Sin embargo, los estudios sobre biología evolutiva y especiación se centran principalmente en la adquisición de aislamiento reproductor (Perfectti, 2003), esto es, usan el concepto biológico de especie (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942). Este concepto define a las especies como un grupo de organismos reproductivamente aislado, es decir, que forman un linaje evolutivo diferenciado y existen barreras geográficas y/o biológicas que impiden el intercambio genético con otras poblaciones. Estos organismos constituyen poblaciones independientes en cuanto a su respuesta genética a las fuerzas ambientales que causan el cambio evolutivo (Brown & Lomolino, 1998). El aislamiento reproductor es un rasgo biológicamente muy relevante, ya que en base a éste podemos saber cómo están las especies de diferenciadas y en cómo lo estarán en el futuro (Hollocher, 2000). Sin embargo, este concepto falla cuando lo aplicamos a especies fósiles o a especies con reproducción asexual. Además, hay muchos ejemplos de especies que se hibridan y producen descendencia viable y fértil (Perfectti, 2003).

Tabla 1. Principales conceptos de especie. Sintetizado y adaptado de Wheeler & Meier 2000 y Perfectti 2003.

Concepto	Autor-es	Criterios	Problemas
Morfológico	naturalistas de los siglos XVIII y XIX	características morfológicas	categorización en desacuerdo con la genética, sin marco evolutivo
Fenético	Sneath & Sokal, 1973	análisis morfométricos y taxonomía numérica	categorización en desacuerdo con la genética, sin marco evolutivo
Agrupamiento genotípico	Mallet, 1995	análisis genéticos	sólo fácilmente aplicable a especies en contacto directo
Biológico	Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942	aislamiento reproductor	conceptos no aplicables a especies fósiles, especies con reproducción asexual; casos de hibridación
Reconocimiento	Paterson, 1985	interacciones entre los miembros	
Evolutivo	Wiley, 1981	aislamiento por barreras ecológicas y geográficas	conceptos muy difíciles de aplicar directamente (por ejemplo en condiciones de campo), puesto que es necesario realizar estudios en varias disciplinas: estudios ecológicos, morfológicos, genéticos, demográficos, biogeográficos,...etc.
Filogenético	Cracraft, 1989	apomorfias y sinapomorfias	
Genealógico	Baum & Shaw, 1995	exclusividad	
Cohesivo	Templeton, 1989	intercambiabilidad genética y/o demográfica	

1.2 Fuerzas evolutivas involucradas en el proceso de especiación

Durante el proceso de especiación dos o más especies contemporáneas evolucionan a partir de una sola población ancestral. La especiación es la divergencia de las poblaciones en sus características genéticas como resultado de fuerzas evolutivas como la deriva genética, la selección natural, la selección sexual, el flujo genético y la mutación. Los alelos, es decir, las diferentes formas de un gen en el mismo locus, son los responsables de las diferencias entre los individuos en sus rasgos hereditables. Estas fuerzas evolutivas actúan para cambiar las frecuencias de los alelos dentro de las poblaciones a lo largo del tiempo (Hollocher, 2000).

La **deriva genética** es el cambio al azar en la frecuencia de los alelos causado a lo largo de las generaciones de una población finita (Hollocher, 2000). Es una fuerza relativamente débil, pero importante a lo largo de muchas generaciones. Su efecto en grandes poblaciones es relativamente pequeño, pero puede influenciar de forma importante la evolución de pequeñas poblaciones como ocurre en las islas, donde nuevas especies empiezan a partir de pequeñas poblaciones fundadoras (Brown & Lomolino, 1998). Los ejemplos más clásicos de este proceso los podemos encontrar en

la clase aves, en el grupo de los Drepanídeos en Hawái y los Geospícidos en las Galápagos (ver Schluter, 2000).

La **selección natural** es el proceso evolutivo por el cual variaciones hereditables favorables a determinados ambientes son preservadas y llegan a ser más comunes en generaciones sucesivas dentro de una población (Darwin, 1859). Este proceso modifica la tasa reproductora o la eficacia biológica de los seres vivos en relación con características heredables, dando lugar a cambios en las frecuencias de los fenotipos de la población en generaciones futuras (Soler, 2003). Se trata de una potente fuerza para el cambio evolutivo, tanto en pequeñas como en grandes poblaciones. Fue Darwin en 1872 el primero en popularizar la idea de que la especiación podría ocurrir a través de la prolongada acción de la selección natural (Hollocher, 2000). Durante muchas generaciones, los alelos para determinados rasgos adaptativos tienden a incrementar su frecuencia a expensas de alelos que confieren menor eficacia biológica. Las poblaciones tienden a divergir si existe suficiente variación en el ambiente para seleccionar diferentes características de acuerdo con diferentes condiciones ambientales (Brown & Lomolino, 1998). Así, en especies con amplias áreas de distribución, ya que las condiciones ambientales (presiones selectivas) suelen cambiar a lo largo del rango distribucional, diferentes fenotipos pueden verse favorecidos como la forma más eficiente de explotar las diferentes condiciones locales (West-Eberhard, 2003). La variación geográfica en rasgos morfológicos es un fenómeno ubicuo en todos los organismos y sólo unas pocas especies no la muestran (Thorpe, 1987). De hecho, hay multitud de ejemplos de cómo los animales se han adaptado a diferentes presiones selectivas (ver Stearns & Hoekstra, 2000; Pough et al., 2005). Un ejemplo típico es la regla de Bergman: la variación del tamaño corporal respecto a gradientes térmicos latitudinales (Bergman, 1847). Mientras que muchas especies de mamíferos, aves y algunos reptiles como las tortugas siguen positivamente esta regla, es decir, su tamaño corporal aumenta con la latitud, otros grupos como los lagartos y las serpientes siguen la inversa (Ashton & Feldman, 2003). Otro ejemplo de adaptación por selección natural a diferentes presiones selectivas es el de la mimica, esto es, algunas especies se parecen al substrato o a la vegetación que lo cubre para camuflarse mejor y así reducir el riesgo de depredación (ej. serpientes del género *Storeria*, King, 1997) o para no ser vistas por sus potenciales presas (ej. *Panthera pardus*, McDonald, 2006).

La **selección sexual** es un mecanismo que mejora la habilidad de los organismos para reproducirse y dejar mayor descendencia. Ésta surge de las diferencias en el éxito reproductivo causado por la competición en los apareamientos. La variación en el éxito reproductivo puede ser frecuentemente alta, especialmente para los machos, por eso la adaptación al ambiente reproductor puede incluso ser más efectiva promoviendo cambios que la adaptación al medio ambiente. Así, en los machos puede resultar en la rápida divergencia de rasgos relacionados con la reproducción, como

por ejemplo la morfología genital, la composición y abundancia del esperma u otras características sexuales secundarias (ej. la cornamenta de los machos de los ungulados, McDonald, 2006). La presión sexual existente en los organismos para poder reproducirse asegura la coevolución y la adaptabilidad de los sistemas de reproducción en machos y hembras. Dentro de los sistemas reproductivos se incluyen aspectos comportamentales relacionados con el reconocimiento del otro sexo, cortejo y acoplamiento, así como rasgos fisiológicos relacionados con la gametogénesis, fertilización y la producción de descendencia (Hollocher, 2000). Ejemplos de selección sexual y que llevan al dimorfismo sexual se dan en muchos vertebrados, como en algunos anfibios urodelos (ej. *Triturus sp.*, García-París et al., 2004), reptiles camaleónidos (ej. *Chamaleo jacksonii*, Halliday & Adler, 2007), aves galliformes (ej. *Pavo cristatus*, Perrins, 2005) o mamíferos carnívoros (ej. *Panthera leo*, McDonald, 2006). La selección sexual puede llevar a la especiación, ya que puede facilitar la divergencia en el reconocimiento de pareja entre poblaciones (Panhuis et al., 2001). Así, es frecuente encontrar especies idénticas que sólo difieren en la morfología de la genitalia (ej. grillos americanos *Grillus sp.*, Gray & Cade, 2000; arañas saltadoras *Habronattus pugillis*, Masta & Madison, 2002).

El **flujo genético** es el movimiento de los alelos, dentro de una población o entre diferentes poblaciones, causado por la dispersión de los gametos o de la descendencia. Tiende a actuar en contra de la deriva genética y la selección natural, pues retarda la divergencia genética. Los individuos que migran a una nueva área, y que portan sus genes con ellos, si se reproducen exitosamente, inyectan sus genes dentro de la población local. Esta migración genética tiene una influencia homogenizadora, previniendo o por lo menos retardando el desarrollo de poblaciones diferenciadas geográfica y genéticamente (Brown & Lomolino, 1998). Ejemplos recientes de fenómenos de flujo genético ocurren entre especies introducidas por el hombre y especies autóctonas, como es el caso de muchas especies de plantas y animales, tanto insectos como vertebrados (Mooney & Cleland, 2001; Pagano et al., 2003; Olden et al., 2004; Kenis et al., 2009).

La selección (natural o sexual) y la deriva genética sólo pueden actuar cuando existe variabilidad genética. Aunque algo de variabilidad puede ser generada a través de la recombinación genética y la selección al azar de los gametos durante la reproducción, la **mutación** espontánea es la principal fuente de variación genética (Hollocher, 2000). Las mutaciones espontáneas se producen de forma natural en los individuos de las diferentes poblaciones, debido a errores producidos a escala molecular como consecuencia de fallos durante el proceso de replicación del ADN. En organismos pluricelulares tales errores ocurren con una probabilidad de entre 10^{-5} y 10^{-14} según la especie (Cabrero & Camacho, 2003). Normalmente, las mutaciones espontáneas son dañinas para el individuo, lo que se traduce en la muerte de éste o en su menor eficacia biológica y por lo tanto no

suelen pasar a generaciones posteriores. Sin embargo, en ocasiones son beneficiosas, representando una ventaja adaptativa frente al resto de individuos de la población, ya que confieren una mayor eficacia biológica al individuo en el que ocurre, aumentando así el éxito reproductor de éste y por lo tanto pasando a sucesivas generaciones (Cabrero & Camacho, 2003). Un ejemplo de mutación espontánea es la que ocurre en la tirosinasa (TYR) y tiene como consecuencia el albinismo en muchas especies de animales, como los gatos domésticos (Imes et al., 2006).

1.3 Aislamiento reproductor y barreras para el flujo genético

El libre intercambio de genes entre poblaciones que se están adaptando a diferentes nichos inhibe la evolución de sistemas genéticos independientes. Tan pronto como se forman las combinaciones de genes adaptativos, se deshacen por la recombinación causada por la reproducción entre individuos de diferentes poblaciones (Bush, 2001). El **aislamiento reproductor** es la incapacidad de producir descendencia viable por parte de los individuos de diferentes poblaciones (Brown & Lomolino, 1998). Éste puede ser producido por diferentes barreras reproductivas agrupadas en dos tipos: pre-zigóticas y post-zigóticas.

Las **barreras pre-zigóticas** incluyen todas aquellas situaciones que impiden la reproducción como el aislamiento ecológico o de hábitat, el aislamiento estacional o temporal, el aislamiento sexual o etológico, así como barreras mecánicas o fisiológicas para la reproducción, como el aislamiento por diferentes polinizadores y el aislamiento de los gametos que bloquean la fertilización (Hollocher, 2000).

Las **barreras post-zigóticas** incluyen aquellas situaciones post-cópula que reducen la eficiencia de los híbridos, como la mortalidad de los cigotos, la inviabilidad de los híbridos, la esterilidad de los híbridos y la baja eficiencia de los híbridos en el uso de determinados recursos (Hollocher, 2000; Perfectti, 2003).

1.4 Modos de especiación

La especiación conlleva el debilitamiento de las fuerzas que mantienen a las poblaciones juntas, como por ejemplo el flujo genético, el compartir sistemas reproductivos, sufrir mutaciones recurrentes o la selección natural en el mismo ambiente, y favorece la ocurrencia de otras fuerzas que llevan a la divergencia de las poblaciones, como por ejemplo la acción de la deriva genética, sufrir mutaciones diferentes y la selección natural y sexual en diferentes ambientes en ausencia de flujo genético (Hollocher, 2000).

Existen varias clasificaciones basadas en diferentes criterios para distinguir los modos de especiación, como por ejemplo una clasificación centrada en los mecanismos que llevan a la evolución

del aislamiento reproductor (ver Schluter, 2001) o una clasificación basada en la distribución geográfica resultante tras el proceso (ver Perfectti, 2003). Sin embargo, una clasificación diferenciando entre los modos de especiación geográficos (alopátricos) y los ecológicos (no alopátricos) es la más utilizada en biología evolutiva (Bush, 2001).

1) La **especiación geográfica o alopátrica** es quizá el modo de especiación más simple y frecuente (Brown & Lomolino, 1998; Salomon, 2001). Ocurre cuando las poblaciones se aíslan y la falta de intercambio genético permite el desarrollo de diferencias genéticas regionales en respuesta tanto a la selección natural como a la deriva genética. En este caso, las poblaciones alopátricas pueden desarrollar mecanismos de aislamiento reproductor que impiden la reproducción una vez que las poblaciones vuelven a contactar (contacto secundario) (Schluter, 2001). Este proceso de especiación puede ocurrir de dos maneras:

a) **especiación dicopátrica o vicariante** (Fig. 1a), que ocurre cuando una población con una amplia zona de distribución es dividida en dos o más sub-poblaciones por una barrera que impide el paso de los individuos. Un ejemplo bien documentado de este tipo de especiación es el producido por la aparición del Istmo de Panamá hace unos 3 m.a., que dividió las poblaciones de organismos acuáticos de los océanos Pacífico y Atlántico (ver Perfectti, 2003);

b) **especiación peripátrica** o de evento fundador (Fig. 1b), que ocurre cuando una hembra fertilizada o un pequeño número de individuos fundadores establecen una población geográficamente aislada. Un ejemplo de este tipo lo constituyen el amplio número de especies de *Drosophila* que aparecen distribuidos por el archipiélago de Hawai (DeSalle & Hunt, 1987);

La especiación geográfica o alopátrica puede o no ir acompañada de una transformación ecológica, debido a que el aislamiento reproductor entre poblaciones hermanas llega como resultado de los cambios genéticos que se originan y acumulan de forma independiente en cada población durante el período de aislamiento geográfico (Bush, 2001).

2) La **especiación ecológica o no alopátrica** conlleva inevitablemente un cambio para un nuevo nicho durante el proceso de especiación; la adaptación a diferentes hábitats es la fuerza que inicia y mantiene la divergencia genética. La selección divergente sobre la variación genética existente lleva a la evolución del aislamiento reproductor, así como, diferentes rasgos de variación genética son favorecidos por cada hábitat diferente. La emergencia del aislamiento reproductor es también facilitada cuando ocurre la reproducción dentro de un hábitat determinado o cuando existe una preferencia para reproducirse con una determinada variación sexual fenotípica, la cual está asociada a un determinado hábitat. En los organismos con reproducción sexual se reconoce la existencia de tres modos de especiación ecológica o no alopátrica:

- a) **especiación parapátrica** (Fig. 1c), que tiene lugar cuando especies hermanas evolucionan por adaptación a hábitats contiguos pero espacialmente segregados o ecotonos a lo largo de una estrecha zona de contacto. Un ejemplo de este tipo de especiación lo puede constituir la planta *Anthoxanthum odoratum*: varias poblaciones desarrollan tolerancia a metales pesados, lo que representa un factor selectivo muy importante en determinadas áreas y lleva a la aparición de aislamiento reproductivo con otras poblaciones no tolerantes (ver Perfectti, 2003);
- b) **especiación simpátrica** (Fig. 1d), que ocurre en ausencia de segregación geográfica cuando especies hermanas evolucionan dentro del mismo rango dispersión, normalmente usando distintos nichos ecológicos, es decir, por adaptación a diferentes recursos. Ejemplos de este tipo de especiación lo constituyen diversas especies de cíclidos que habitan lagos africanos situados en antiguos cráteres (Schliewen et al., 1994);
- c) **hibridación** (fig. 1e), que ocurre cuando nuevas especies rápidamente evolucionan a partir de la reproducción entre especies hermanas por una variedad de diferentes procesos. La hibridación como modo de especiación es un fenómeno frecuente en plantas, aunque muy raro en animales (Bush, 2001). Sin embargo, ha sido descrito en algunos vertebrados como por ejemplo las especies del complejo *Rana (esculenta)* del oeste de Europa (Semtlich & Reyer, 1992; Semtlich, 1993a, 1993b).

Figura 1. Principales modos de especiación. Adaptado de Bush 2001.

1.5 Hibridación y zonas de contacto secundario

La hibridación natural se define como el proceso por el que individuos de diferentes poblaciones o grupos de poblaciones que son distinguibles en base a uno o más caracteres hereditables, incluyendo por lo tanto individuos de especies y subespecies distintas, producen descendencia fértil (Barton & Hewitt 1985; Harrison 1990; Arnold, 1997; Burke & Arnold, 2001). Este concepto va en contra de muchos de los conceptos de especie conocidos, particularmente el concepto biológico de especie (Dobzhanski, 1937; Mayr 1942), que establece como medio para diagnosticar las especies el aislamiento reproductor. Sin embargo, la hibridación natural ya se conoce desde la época de Linneo, quien propuso un modelo de especiación por hibridación en base a las especies que hibridaban satisfactoriamente (Arnold, 1997). Desde la primera mitad del siglo XX la hibridación natural ha sido clásicamente interpretada bajo dos corrientes: i) la de los botánicos, seguidores de Lot-sy (1931), quienes reconocen el potencial evolutivo de los genomas híbridos para ocupar nuevos hábitats; ii) la de los zoólogos, quienes se basan en que ésta es un proceso mal-adaptativo ya que produce una descendencia con poca eficacia biológica.

En la actualidad han sido descubiertas muchas **zonas híbridas**, es decir, zonas donde ocurre el proceso de hibridación entre dos o más especies. Algunas de ellas son debidas a la introducción de especies alóctonas que hibridan con especies autóctonas (ej. Goodman et al., 1999; Brede et al., 2000; Mooney & Cleland, 2001; Pagano et al., 2003; Riley et al., 2003; Fitzpatrick & Shaffer, 2004; Olden et al., 2004; Rubidge & Taylor, 2004; Bleeker & Matthies, 2005; Costedoat et al., 2005; Kenis et al., 2009), mientras que, muchas otras, se corresponden a zonas de contacto secundario entre especies más o menos cercanas filogenéticamente (ej. Howard, 1986; Szymura & Barton, 1986, 1991; Cesaroni et al., 1992; Parsons et al 1993; Sullivan, 1995; Jiggins et al., 1996; Kato-h & Ribi, 1996; Kubota et al., 1998; Davison et al., 1999; McDonald et al 2001; Rohwer et al 2001; Veen et al 2001; Bronson et al 2003; Dasmahapatra et al., 2002; Gee, 2004; Mabry & Verrrell 2004; Patten et al., 2004; Ray et al., 2004; Alexandrino et al., 2005; Babick et al., 2005; Bettles et al., 2005; Gaubert et al., 2005; Saldamando et al., 2005; Takami & Suzuki, 2005; Brodin & Haas 2006; Gibbs et al., 2006; Mulcahy et al., 2006; Pusch et al., 2006; Stein & Uy 2006; Vörös et al., 2006; Baumgarten & Williamson, 2007; Dorken & Pannell, 2007; Reudink et al., 2007; Blum, 2008; Mebert, 2008).

Teóricamente, cuando especies hermanas vuelven a establecer contacto tras el proceso de especiación alopátrica que las formó, pueden darse tres situaciones (Brown & Lomolino, 1998):

- 1) los individuos de las diferentes poblaciones pueden no hibridar o fallar al producir híbridos viables, entonces el aislamiento reproductor es completo, es decir, ha ocurrido el proceso de especiación;

- 2) los individuos de diferentes poblaciones pueden hibridar extensivamente, produciendo híbridos viables y fértiles, entonces las poblaciones podrían llegar a fusionarse y deshacer sus diferencias genéticas o la población híbrida puede ser solo biológicamente eficaz en la zona de hibridación, funcionando ésta como una barrera reproductora;
- 3) los individuos de diferentes poblaciones pueden hibridar, pero los híbridos son menos eficaces que la descendencia entre los parentales de la misma población, en este caso la selección favorece aquellos individuos que escogen reproducirse con los de su misma población, lo que lleva al aislamiento reproductor y finalmente a completar el proceso de especiación.

En base a este último caso surge la **hipótesis de reforzamiento**, que predice el desarrollo de barreras pre-zigóticas para evitar la formación de híbridos con menor eficacia biológica cuando dos especies hermanas establecen contacto secundario (Perfectti, 2003). Así, por ejemplo, la elección de una hembra de reproducirse con un macho puede contribuir al mantenimiento de la zona híbrida cuando el macho es de la otra especie hermana (Veen et al., 2001), pero también contribuye a reducir el proceso de hibridación y a la adquisición de aislamiento reproductor, cuando se trata de un macho de la misma especie, ya que se establecen barreras pre-copulatorias para el flujo genético (reforzamiento) (ver revisión en Servedio & Noor, 2003; e.j. Hoskin et al., 2005; Higgie & Blows, 2007). De hecho, mecanismos pre-copulatorios que llevan a diferencias en la selección de pareja o en la capacidad de competición por ésta han sido identificados en los rasgos sexuales secundarios de especies hermanas en varias zonas de contacto secundario (ej. Parsons et al., 1993; McDonald et al., 2001; Rohwer et al., 2001; Veen et al., 2001; Bronson et al., 2003; Stein & Uy, 2006).

Tradicionalmente, la hibridación natural, se ha considerado como un medio para completar el proceso de especiación (Mayr, 1963; Hewitt, 1988; Jiggins & Mallet, 2000) y el estudio de las zonas híbridas ha sido contemplado como una poderosa herramienta en el estudio de este proceso (Dobzhansky, 1937, 1940; Mayr, 1942; Barton & Hewitt, 1985, 1989). Por eso, las zonas híbridas han sido denominadas “laboratorios naturales” para el estudio de los procesos evolutivos (Hewitt, 1988). La comprensión de los orígenes, evolución, dinámica y destino de las zonas híbridas requiere información proveniente de una multitud de disciplinas, incluyendo la taxonomía, genética, biología molecular, etología, ecología, biogeografía y paleoclimatología (Hewitt, 1988). En la mayoría de las zonas híbridas están involucrados linajes con diferencias fenotípicas obvias, así como algún grado de aislamiento pre- o post-zigótico (Barton & Hewitt, 1989; Harrison, 1993). Sin embargo, varios estudios filogeográficos han revelado la existencia de zonas de contacto secundario entre linajes genéticamente diferentes, pero que son morfológicamente crípticos, es decir, aparentemente similares (Phillips et al., 2004; Hoskin et al., 2005; Leaché & Cole, 2007; Pinho et al., 2007).

En la mayoría de las zonas híbridas están involucrados linajes con diferencias fenotípicas obvias, así como algún grado de aislamiento pre- o post-zigótico (Barton & Hewitt, 1989; Harrison, 1993). Sin embargo, varios estudios filogeográficos han revelado la existencia de zonas de contacto secundario entre linajes genéticamente diferentes, pero que son morfológicamente crípticos, es decir, aparentemente similares (Phillips et al., 2004; Hoskin et al., 2005; Leaché & Cole, 2007; Pinho et al., 2007).

Actualmente, la hibridación natural es considerada como un proceso generador de nuevos genotipos, ya que de la combinación de dos genomas parentales puede resultar una evolución adaptativa y, consecuentemente, la fundación de nuevas líneas evolutivas que originan especies híbridas, y también como un mecanismo que permite la expansión de las especies en hábitats desfavorables, ya que la introgresión genética de una especie en la otra puede dar lugar a la transferencia de adaptaciones que permiten la colonización de nuevos hábitats (Arnold, 1997; Burke & Arnold, 2001). Cuando la descendencia híbrida presenta una adaptabilidad superior en el hábitat disponible, las especies híbridas pueden llegar a independizarse de las ancestrales, invadiendo nuevos hábitats o substituyendo una de las especies parentales (ej. Cruzan & Arnold, 1993; Choler et al., 2004).

Las zonas híbridas pueden clasificarse en base a criterios espaciales o de estabilidad. Desde el punto de vista **espacial** podemos hablar de *zonas híbridas clinales* o *zonas híbridas en mosaico* (Harrison, 1990). En las primeras, la hibridación entre los parentales origina la formación de una zona de transición suave o de clinas abruptas de las características típicas (genéticas y/o fenotípicas) de una forma parental a la otra. Las segundas se caracterizan por presentar clinas o zonas de transición parecidas a las clinales, pero distribuidas de forma irregular, conforme a la diferente adaptación de las especies parentales a determinadas condiciones o características de los hábitats. Desde el punto de vista de la **estabilidad** podemos hablar de *zonas híbridas temporales* o efímeras (Darwin, 1859; Mayr, 1942; Dobzhansky, 1937; Wilson, 1965) o *zonas híbridas estables* (Moore, 1977; Eckenwalder, 1984; Barton & Hewitt, 1985). En las primeras la hibridación puede acabar tanto en especiación, debido al refuerzo de las barreras para el aislamiento reproductor, como en fusión de los taxones híbridos, debido a la introgresión genética. Mientras que, en las segundas, ocurre un equilibrio dinámico, es decir, se establece la posibilidad de una estrecha zona híbrida entre las especies parentales, estable en el tiempo. Este tipo de zonas híbridas puede mantenerse debido a la actuación de dos mecanismos: la dispersión, es decir, la migración de los individuos parentales para la zona de contacto y los híbridos para fuera de ésta, y la selección natural, que puede actuar de manera *intrínseca* o *endógena*, cuando se debe a la existencia de un mecanismo de incompatibilidad genética entre los individuos, como por ejemplo selección en contra de los heterocigóticos y/o genotipos raros y selección epistática (Barton, 1979; Barton & Hewitt, 1985), y/o

extrínseca o *exógena*, cuando entran en juego los factores ambientales (Rieseberg et al., 2000).

Cuando las zonas híbridas se mantienen por **selección extrínseca o exógena**, la existencia de un gradiente de hábitats se traduce en diferencias graduales en la capacidad de adaptación de los genotipos parentales e híbridos. Se define así el **Modelo de Superioridad de los Híbridos** (Moore, 1977), en el que los genotipos híbridos presentan una mayor capacidad de adaptación que los parentales a determinadas áreas, normalmente marginales o de transición –ecotonos-, poseyendo por el contrario menor capacidad de adaptación en los hábitats de los parentales. Sin embargo, varios estudios de laboratorio y de campo han demostrado que los híbridos no tienen por qué estar restringidos a estas zonas de ecotonos, pudiendo presentar una adaptabilidad semejante e incluso superior a la de las formas parentales (Arnold & Hodges, 1995a, b).

Los modelos de Howard (1982, 1986) y Harrison (1986, 1990) también proponen que la estructura de la zona híbrida depende de las características ambientales (selección exógena), pero en este caso la existencia de los híbridos en la zona de transición se debe a una fuerte dependencia de las formas parentales a determinadas características del hábitat, ejerciendo una fuerte selección contra los híbridos.

Basados en sus estudios matemáticos y empíricos de las zonas híbridas animales, Barton y Hewitt (Barton, 1979; Barton & Hewitt, 1985) desarrollaron los fundamentos de los modelos de **Zonas de Tensión o Teoría de las Clinas**. En esta teoría el mantenimiento de las zonas híbridas es independiente del hábitat y resulta de un balance entre la dispersión y la selección contra los híbridos por incompatibilidad genética (selección intrínseca). Aunque la teoría de las Zonas de tensión es la más utilizada actualmente (ej. Szymura & Barton 1986, 1991; Sites et al., 1995; Phillips et al., 2004; Božíková et al., 2005), algunos trabajos han demostrado la influencia de ambos factores, endógenos y exógenos, en la concordancia y variación de las clinas para estos modelos (ej. zona híbrida del género *Bombina*; Szymura & Barton, 1986, 1991; Szymura 1993). Estos trabajos ponen en evidencia la necesidad de analizar las zonas híbridas no sólo desde la perspectiva genética y fenética, sino que también desde el punto de vista ecológico, comportamental y reproductor, para un mejor entendimiento de los factores responsables de la dinámica y estructura de las zonas híbridas a lo largo del tiempo.

Bajo este escenario de comprensión multidisciplinar de las zonas de contacto, creo necesario introducir una serie de conceptos clásicos en ecología como son la competencia interespecífica y la segregación de nicho, y que abordo en el siguiente epígrafe.

2. COMPETENCIA INTERESPECÍFICA Y SEGREGACIÓN DE NICHOS

El **nicho fundamental** de una especie se define como el rango de condiciones ambientales (físicas y biológicas) bajo el cual un organismo puede existir; no obstante, debido a presiones e interacciones con otros organismos, las especies se ven forzadas a ocupar un nicho más estrecho y para el que están muy bien adaptadas: el **nicho realizado** (Hutchinson, 1957). Existen diversas formas de interacción entre los organismos, como por ejemplo la depredación, el parasitismo, el mutualismo o el detritivorismo (Begon et al., 1999). Sin embargo, la **competencia interespecífica** y los mecanismos que permiten la coexistencia de las especies más próximas filogenéticamente han suscitado, durante mucho tiempo, un gran interés entre los ecólogos (Schoener, 1974).

Teóricamente, cuando contactan dos especies con similares requerimientos ecológicos, suele darse una situación de competencia interespecífica que puede llevar a la **exclusión competitiva** de la especie menos eficaz o a la **segregación de nicho** (Cuadro 1).

Cuadro 1. Esquema ilustrativo de las respuestas ecológicas de dos o más especies competidoras en coexistencia.

2.1 Competencia interespecífica entre especies cercanas

La competencia interespecífica ocurre cuando los recursos son limitados y dos o más especies, con similares requerimientos ecológicos, comparten un misma área; una de ellas puede sufrir una reducción de la fecundidad, la supervivencia o el crecimiento como resultado de la explotación de los recursos o de la interferencia por parte de individuos de la otra especie (Begon et al., 1999).

Varios experimentos de laboratorio y algunos trabajos de campo han confirmado el potencial de la competencia interespecífica para alterar la dinámica de poblaciones, comunidades y la evolución de especies que interactúan (ej. Connell, 1983; Schoener, 1983, 1985; Sih et al., 1995; Abramsky et al., 2001; Cameron et al., 2007; Gröning & Hochkirch, 2008). Entre ellos, destacan los experimentos de laboratorio llevados a cabo por G.F. Gause en 1934, que pusieron en relieve la capacidad de una especie de llevar a la otra a la extinción del área de coexistencia **-Principio de Exclusión competitiva-** (Gause, 1935), debido a una mayor eficiencia en la utilización de los recursos.

Las especies más próximas filogenéticamente, pertenecientes al mismo género, suelen presentar nichos muy parecidos y superpuestos, ya que éstos son producto de la divergencia del nicho del ancestro común (*Teoría de Conservación del Nicho*, ver Wiens & Graham, 2005). Por lo tanto, una situación de elevada competencia interespecífica se presupone en los casos en que dos especies cercanas filogenéticamente comparten un determinado área. Aunque también ocurre entre especies no emparentadas filogenéticamente, debido muchas veces a fenómenos de convergencia ecológica en el aprovechamiento de los mismos recursos (ver Taper & Case, 1992), los requerimientos ecológicos de las especies más cercanas son tan similares que, en caso de coexistencia, normalmente competirán por los mismos recursos.

Sin embargo, muchas veces es muy difícil probar la existencia de competencia interespecífica, sobre todo en el campo, con lo que no sabemos hasta qué punto lo que observamos es fruto de interacciones competitivas o es más bien debido a las diferentes características biológicas de las especies que coexisten. Esto se hace muy patente cuando se estudian los requerimientos de nicho de especies cercanas en coexistencia y que muestran diferencias, a veces mínimas, en el uso de los recursos. Es lo que se ha llamado “**el fantasma de la competencia en el pasado**” (Connell, 1980), una coexistencia debido a una respuesta evolutiva ante una situación de competencia en el pasado (Begon et al., 1999).

2.2 Segregación de nicho

Ante una situación de competencia interespecífica, la selección natural puede favorecer una divergencia ecológica entre las especies que interactúan, es decir, puede llevar a la diferenciación o **segregación de nicho** (Pianka, 1973; Ricklefs, 1998). Usando diferentes recursos las interacciones

competitivas se relajan y esto permite una coexistencia estable. Este fenómeno ha sido comprobado en muchos estudios sobre requerimientos de nicho entre especies competidoras en coexistencia y que han puesto en relieve la existencia de mecanismos de:

- i) **segregación trófica**, es decir, diferencias en la dieta, ya sea depredando sobre distintas presas (ej. Genner et al., 1999) o las mismas, pero de diferente talla (ej. García & Arroyo, 2005). Es el tipo de segregación ecológica más frecuente entre muchas especies de animales y puede estar asociado con el *desplazamiento de caracteres* (ver *character displacement* en Taper & Case, 1992), como por ejemplo en mamíferos carnívoros, asociado con cambios en la dentición (Dayan et al., 1992), y en murciélagos -*Myotis bechsteinii* y *M. nattereri*-, asociado con diferencias en el sistema sensorial de percepción de presas (Siemers & Swift, 2006). Además, es el mecanismo fundamental que permite la coexistencia entre muchas especies de serpientes marinas y tropicales (Luiselli 2006);
- ii) **segregación espacial**, es decir, diferencias en el uso del espacio, ya sea a gran escala, segregación de hábitat (ej. Hart, 2003), como a menor escala, segregación de micro-hábitat (ej. Langkilde & Shine, 2004). Es el mecanismo fundamental de coexistencia entre la mayoría de las especies de vipéridos de las regiones templadas (Luiselli, 2006);
- iii) **segregación temporal**, es decir, diferencias en los patrones temporales de actividad, tanto en los patrones diarios (ej. Holm & Edney, 1973), como en los estacionales (ej. Graves & Duvall, 1990; Schuett et al., 2005).

Por lo tanto, la diferenciación en una de estas dimensiones del nicho de una especie, o una combinación de diferencias en varios nichos (ej. Pianka et al. 1979; Ziv et al., 1993; Brodman & Jaskula, 2002; Loveridge & Macdonald, 2003), puede permitir la partición de los recursos y con ello la coexistencia ecológica de las especies muy similares.

Sin embargo, diferencias en el uso de los recursos pueden tener repercusiones en los rasgos reproductivos y demográficos de especies en competencia (ej. Clarke, 1992). Estas diferencias pueden conferir ventajas competitivas a una de las especies en detrimento de las otras, puesto que, afectan a la dinámica de las poblaciones (Cutton-Brock, 1990).

Como veremos a continuación, la competencia interespecífica, en forma exclusión competitiva, ha jugado un papel muy importante en las zonas de contacto durante las glaciaciones del Pleistoceno, puesto que ha contribuido a los procesos de expansión y/o retracción de los rangos de distribución de las diferentes formas o especies que pueblan el continente europeo.

3. ESPECIACIÓN DURANTE EL CUATERNARIO

Debido a los cambios en la incidencia de la energía solar, la Tierra está sufriendo constantemente fenómenos periódicos que crean un clima dinámico (Zachos et al., 2001). Algunos cambios ocurren a una escala temporal perceptible por el ser humano y tienen consecuencias biológicas directas, como por ejemplo los ciclos diarios de luz o la variación estacional. Sin embargo, otros ocurren a una escala temporal mayor y contribuyen a oscilaciones periódicas en la historia climática. Como consecuencia, la vida en nuestro planeta ha sufrido multitud de cambios de distribución y fenómenos de extinción y especiación hasta alcanzar la distribución y diversidad que muestra actualmente.

La historia climática de la Tierra se caracteriza por la alternancia de períodos cálidos y fríos. Los responsables de este ritmo climático son los cambios que se dan en tres parámetros orbitales descritos por Croll-Milankovitch (Hewitt, 2000; Zachos et al., 2001):

- 1) cambios en la excentricidad de la órbita de la Tierra alrededor del Sol, variando desde una órbita casi circular hasta otra elíptica, con un ciclo de 400 a 100 mil años;
- 2) cambios oblicuidad del eje de la Tierra en relación al plano de órbita, variando de 22.1° a 24.5°, con un ciclo de 41 mil años;
- 3) cambios en la precisión axial o balanceo en el eje de rotación, ocurriendo cada 23 y 19 mil años.

A lo largo de la mayoría de la era Mesozoica y de la Cenozoica temprana el clima global fue relativamente cálido e igual en todo el planeta, con pequeñas variaciones debidas a las estaciones o a la latitud. Esta situación cambió hacia finales del Plioceno, hace unos 2.4 millones de años (m.a.), debido a un proceso de enfriamiento global que provocó, entre otras cosas, el desarrollo del casquete polar del hemisferio norte.

Los últimos 1.8 m.a. de historia del planeta se caracterizan por la ocurrencia de multitud de oscilaciones climáticas, con un ciclo dominante de unos 100 mil años, siendo las más importantes las ocurridas los últimos 700 mil años (Fig. 2) (Webb & Bartlein, 1992). Estas oscilaciones climáticas tuvieron diferentes consecuencias en las distintas partes del globo dependiendo de la distancia al Ecuador, la distancia al océano, la existencia de corrientes oceánicas, la forma de las masas continentales y la presencia de accidentes geográficos como las montañas (Hewitt, 1996). Hoy en día sabemos que, la actual flora y fauna de Europa, así como sus rangos de distribución a lo largo del continente, son debidas principalmente a los eventos ocurridos durante este período: el Cuaternario (Hewitt, 1996, 1999, 2003; Taberlet et al., 1998).

Figura 2. Temperatura media global del aire durante los últimos 850 mil años, inferida a partir de medidas de los isótopos de oxígeno de los casquetes polares. Los círculos negros marcan los máximos glaciares. Adaptado

3.1 Las oscilaciones climáticas durante el Cuaternario

Tradicionalmente el período Cuaternario se reconoce como el período más reciente de la era Cenozoica y va desde hace aproximadamente 1.8 millones de años hasta la actualidad, incluyendo dos épocas: el Pleistoceno (1.8 - 0.01 m.a.) y el Holoceno (0.01 m.a.- actualidad). Este período se caracteriza por una situación relativamente estable en la dinámica de las placas tectónicas del planeta, de hecho éstas tuvieron prácticamente todo el período la configuración actual, y la dramática ocurrencia de oscilaciones climáticas, como resultado de cambios en la excentricidad de la órbita de la Tierra alrededor del Sol, que provocaron la alternancia de períodos glaciares (períodos de enfriamiento del clima) e interglaciares (períodos cálidos) (Brown & Lomolino, 1998).

Durante los períodos glaciares las latitudes más norteñas (y muchas regiones montañosas situadas no tan al norte) se cubrían por glaciares: masas compactas de hielo con unos 2 o 3 km de espesor y una masa tan grande como para deformar la litosfera sobre la que estaban situados; mientras que en las latitudes medias circundantes a los glaciares el subsuelo se congelaba, haciéndose impermeable, es decir, se convertía en permafrost (Hewitt, 2003). Así, por ejemplo, durante el período glaciar más reciente (hace unos 18 mil años) la masiva capa de hielo Laurentidae cubrió Norte América hasta los 40°N, mientras que la capa de hielo Escandinava sólo cubrió Europa hasta los 52°N (Fig. 3) (Brown & Lomolino, 1998). Los glaciares causaban cambios dramáticos en los vientos predominantes y en las corrientes oceánicas, los cuales afectaban fuertemente a las zonas sin glaciares y a sus climas regionales. Las regiones templadas y tropicales eran comprimidas hacia el Ecuador y sus climas tendían a ser más fríos y húmedos en las primeras, y más secos en las segundas. Este incremento de la aridez en las regiones tropicales redujo considerablemente los bosques tropicales y produjo la expansión de los desiertos (Hewitt, 2003).

Figura 3. Extensión máxima de los hielos en Europa durante el último período glacial, hace aproximadamente 18.000 años. Adaptado de Hewitt 1999.

Sin embargo, los períodos glaciares alternaban con períodos en los que el clima era más cálido (períodos interglaciares), lo que provocaba la retracción de los hielos y la expansión de las regiones templadas y tropicales hacia el norte. Además, durante el Cuaternario el nivel del mar debió fluctuar con una amplitud aproximada de unos 230 m, ya que durante los períodos fríos un gran volumen de agua se congelaba y formaba parte de los glaciares, derritiéndose y volviendo al mar durante los períodos interglaciares (Chappell & Shackleton, 1986; Lario, 1996; Andersen & Borns, 1997; Brown & Lomolino, 1998; Zazo, 1999;).

3.2 Implicaciones de las oscilaciones climáticas sobre las especies

Los patrones biogeográficos de la biota que habitaba la tierra se transformaron profundamente como resultado de las oscilaciones climáticas del Cuaternario. La naturaleza específica de las respuestas biogeográficas de la fauna y flora a estas oscilaciones climáticas varió considerablemente entre las especies y las regiones geográficas. Sin embargo, de manera general, tanto animales como plantas sufrieron una compleja dinámica biogeográfica debida a tres cambios fundamentales en sus ambientes (Brown & Lomolino, 1998):

- i) cambio de localización, extensión y configuración de sus principales hábitats. En los períodos glaciares los patrones zonales de vegetación eran comprimidos hacia el Ecuador o hacia las zonas de baja altitud, mientras que éstos se extendían hacia los polos o hacia zonas de mayor altitud en los períodos interglaciares. De forma general, durante los episodios glacia-

res, ocurrió una expansión de las estepas, sabanas, herbazales, praderas y otros ecosistemas terrestres de tipo “abierto” a expensas de los ecosistemas de tipo “cerrado” (ej. bosques y en especial pluviselva tropical). Esta tendencia se revertía durante los períodos cálidos, pero los tipos de cambios variaron substancialmente entre los biomas, así como lo hicieron la composición específica particular de cada bioma y comunidad;

- ii) cambios en la naturaleza del clima y de las zonas ambientales. La formación y disrupción de corrientes oceánicas, la distancia al océano o a las masas glaciares o la variación en la concentración de gases con efecto invernadero son, entre otros, factores responsables de variaciones muy importantes en cantidad e intensidad de la precipitación y temperatura de las diferentes regiones del planeta. Estos factores variaron considerablemente durante los períodos glaciares e interglaciares, lo que se tradujo en grandes variaciones climáticas regionales, acompañadas de modificaciones muy importantes en las características y la distribución latitudinal de las zonas ambientales;
- iii) formación - disolución de rutas de dispersión. La formación de glaciares y nieves perpetuas en muchas zonas montañosas y su posterior descongelación, así como el descenso y la subida del nivel del mar durante los períodos glaciares e interglaciares, respectivamente, provocaron la formación de barreras geográficas y corredores de hábitats favorables para el movimiento de las especies. Mientras que las barreras impidieron el paso de muchas especies, los corredores sirvieron para las migraciones de muchas especies hacia el sur, hacia refugios glaciares, así como la posterior recolonización hacia el norte durante los períodos interglaciares (ej. Taberlet et al., 1998);

Las respuestas de la biota, que había estado por mucho tiempo adaptada a climas relativamente estables e iguales, también pueden ser clasificadas en tres tipos:

- i) algunas especies fueron capaces de acompañar a sus hábitats óptimos cambiando de latitud y/o altitud. Esto ocurrió fundamentalmente con especies animales de gran movilidad como aves y mamíferos;
- ii) otras especies se mantuvieron donde estaban adaptándose a los nuevos ambientes locales. Este es el caso de los grandes mamíferos, herbívoros y carnívoros, que se especializaron en ambientes glaciares;
- iii) otras especies sufrieron reducción de su rango distribucional e incluso se extinguieron. Esto es lo que le sucedió a la mayoría de las especies de plantas y animales con poca movilidad.

3.3 Respuestas evolutivas y los refugios del Pleistoceno: el caso de Europa

Tal y como ha sido descrita en la sección 1.4 de esta introducción, la divergencia evolutiva de las especies está íntimamente relacionada con las dinámicas biogeográficas y las resultantes mezclas y/o aislamientos de los genes. De esta manera, durante el Pleistoceno, los repetidos cambios y fragmentaciones de los rangos distribucionales de las especies existentes provocaron profundos efectos evolutivos (Brown & Lomolino, 1998), siendo básicamente los responsables de la actual biodiversidad europea. A continuación se trata brevemente las respuestas evolutivas de la biota del Pleistoceno en el continente europeo.

Desde un punto de vista biogeográfico Europa es muy distinta a otros continentes como por ejemplo Norte América, localizada en la misma latitud. Se puede decir que Europa es una gran península, con orientación oeste - este, conectada a Asia. El mar Mediterráneo constituye una gran barrera que limita las posibilidades de desplazamiento de las especies hacia el sur durante los períodos glaciares. Además, los principales accidentes geográficos, como los Alpes y los Pirineos, que también están orientados de oeste a este, actúan como barreras para la expansión de las especies hacia el norte durante los períodos interglaciares (Taberlet et al., 1998).

Durante el Cuaternario cada una de las especies que habitaba Europa sufrió varios episodios de contracciones/expansiones de su rango distribucional (Hewitt, 1996). Cuando descendía la temperatura, durante los períodos glaciares, hubo probablemente muchas extinciones en las poblaciones norteñas. Los rangos distribucionales de muchas especies fueron fragmentados y diferentes enclaves en el sur, como las penínsulas Ibérica, Itálica o Balcánica, e incluso el norte de África, que como consecuencia del descenso del nivel del mar durante algunos períodos glaciares estuvo prácticamente conectada a Europa a través del Estrecho de Gibraltar, sirvieron como refugios para las poblaciones durante los períodos glaciares (Hewitt, 1996, 1999, 2003; Taberlet et al., 1998; Zazo et al., 2000; Collina-Girard, 2001; Weiss & Ferrand, 2007). Cuando la temperatura aumentaba, durante los períodos interglaciares, las poblaciones experimentaban un proceso de expansión hacia el norte a partir de estos refugios en el sur. La importancia de estos refugios en el sur es enorme, no sólo porque permitían la supervivencia de las especies, sino porque también favorecían los procesos de especiación. Al utilizar distintos refugios, diferentes poblaciones de la misma especie fueron aisladas (sin posibilidad de intercambio genético), evolucionando bajo diferentes condiciones ambientales, lo que les llevó a desarrollar diferencias genéticas regionales en respuesta a los procesos de selección natural y deriva genética (Hewitt, 1996, 1999, 2003).

Cuando el tiempo transcurrido en estos refugios era el suficiente como para que se completara el proceso de especiación (especiación alopátrica), las ahora especies hermanas (especies muy próximas filogenéticamente, aisladas reproductivamente) debieron actuar como competidores al

establecer contacto secundario, favoreciéndose los procesos de exclusión competitiva, y por lo tanto, ejerciendo como barreras biológicas durante el proceso de expansión hacia el norte (Hewitt, 1996). Otra vez, los diferentes accidentes geográficos de Europa, como los Alpes, los Pirineos, e incluso, el mar Mediterráneo, sirven de obstáculo en esta recolonización hacia el norte (Hewitt, 1996, 1999, 2003; Taberlet et al., 1998). Pero cuando no transcurría el suficiente tiempo como para que las poblaciones pudieran desarrollar barreras de aislamiento reproductor, éstas seguramente pudieron reproducirse cuando re-establecían el contacto entre sus distribuciones. Un ejemplo de esto lo constituye el caso de las subespecies de la víbora áspid -*Vipera aspis*- (Zuffi & Bonnet, 1999; Zuffi, 2002; Barbanera et al., 2009). Durante el Pleistoceno, las diferentes poblaciones de *V. aspis* utilizaron diferentes refugios durante los períodos glaciares. Así lo atestigua el hecho de que en la actualidad las cuatro subespecies reconocidas tienen áreas de distribución alopatricas con zonas de contacto e integración entre ellas (Zuffi & Bonnet, 1999; Zuffi, 2002; Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006a), donde ocurre intercambio genético (Zuffi et al., 2001; Barbanera et al., 2009).

La historia evolutiva de la biota europea durante el Pleistoceno es mucho más compleja, en parte porque estos períodos de contracción/retracción ocurrieron muchas veces a lo largo de este período, también porque los tiempos de especiación varían entre los diferentes grupos y, cómo no, porque las rutas de re-colonización han variado conforme a las barreras geográficas y a la aparición de especies competidoras. Por estas razones, cada taxón ha respondido independientemente a las oscilaciones climáticas del Cuaternario y, por lo tanto, cada taxón es consecuencia de su propia historia evolutiva (Taberlet et al., 1998). Sin embargo, y a pesar de estas particularidades, podemos asegurar que, durante el Pleistoceno (y en muchos casos desde el Plioceno), las repetidas contracciones/retracciones de los rangos distribucionales y la evolución bajo diferentes condiciones ambientales en los refugios situados al sur, causaron procesos de especiación alopatrica en muchas de las antiguas especies de Europa, resultando la mayoría de la actual biodiversidad del continente, así como sus rangos de distribución (Hewitt, 1996; Taberlet et al., 1998). De hecho, así lo constatan las divergencias genéticas halladas en muchas de las actuales especies y subespecies de plantas, tanto gimnospermas (ej. *Pinus pinaster* Salvador et al., 2000), como angiospermas (ej. *Quercus* sp., Atkinson et al., 2007), y animales, tanto invertebrados (ej. *Timarcha goettingensis*, Gómez-Zurita et al., 2000), como peces (ej. *Barbus* spp., Machordom & Doadrio, 2001), anfibios (ej. *Alytes* spp., Gonçalves et al., 2007; *Chioglossa lusitanica*, Alexandrino et al., 2000), reptiles (ej. *Podarcis* spp., Pinho et al., 2008; *Lacerta schreiberi*, Godinho et al., 2005) y mamíferos (ej. *Lepus* spp., Alves et al., 2008; *Erinaceus* spp. Seddon et al., 2001), que pueblan el continente europeo.

Este escenario de contracción-retracción de los rangos de distribución y uso de refugios en el sur durante el Pleistoceno se supone que también ha influido profundamente en la diversificación y actual distribución de los miembros del género *Vipera*, grupo prácticamente restringido al continente europeo.

4. LA FAMILIA VIPERIDAE

4.1 Encuadre taxonómico

Existe una gran controversia en cuanto a la clasificación de las serpientes (ver Lee & Scanlon, 2002; Slowinski & Lawson, 2002). Una clasificación moderna (conforme a Greene, 2003; Halliday & Adler, 2007) incluiría a las casi 3.000 especies existentes en 438 géneros y 18 familias (Fig. 4). Estas familias se agrupan en dos clados hermanos: los Scoleophidia o serpientes “ciegas” y los Alethinophidia o “verdaderas serpientes”. Dentro de los Alethinophidia podemos diferenciar a su vez otros dos clados, Alethinophidia basal y Macrostromata, incluyendo este último Macrostromata basal (=Henophidia) y Caenophidia o “serpientes avanzadas”.

Caenophidia incluye cinco familias, cuatro de ellas bajo la superfamilia Colubroidea:

- i) Atractaspiidae, con 60 especies en 13 géneros;
- ii) Colubridae, con 1.700 especies en 290 géneros;
- iii) Elapidae, con 270 especies en 62 géneros;
- iv) Viperidae, con 230 especies en 28 géneros.

Figura 4. Clasificación moderna de las serpientes. Según Greene 2003 y Halliday & Adler 2007.

Los primeros Colubroidea se originaron probablemente durante el Oligoceno, bajo un escenario de clima templado y grandes espacios abiertos en el hemisferio Norte o Laurasia (Rage, 1987, 1994a; Greene, 2003). A pesar del reciente origen del grupo, los miembros de Colubroidea han tenido un éxito evolutivo muy grande y, en la actualidad, constituyen más 80% de las especies de serpientes vivas (Rage, 1994b; Halliday & Adler, 2007).

Los miembros de Viperidae, denominados colectivamente “víboras”, son serpientes de constitución robusta, cola corta y cabeza ensanchada posteriormente. Presentan la pupila vertical, exceptuando los miembros del género *Causus*, que la tienen redonda, y un aparato inoculador de veneno de tipo solenoglifo (Fig. 5) (Rage, 1994c).

Figura 5. Tipo de denticiones en las serpientes -A) aglifo; B) opistoglifo; C) proteroglifo; D y D') solenoglifo- y sección transversal de los diferentes tipos de dientes: E) diente típico; F) colmillos opistoglifos; G) colmillos proteroglifos; H) colmillos solenoglifos. Adaptado de Rage 1994c.

Aunque la filogenia de la familia Viperidae ha sido muy bien estudiada a través de trabajos morfológicos, inmunológicos (basados en las afinidades de las albúminas de los sueros sanguíneos) y moleculares, los resultados son antagónicos en lo que se refiere al encuadramiento taxonómico de las subfamilias que la componen (ej. Cadle, 1987, 1992; Ashe & Marx, 1988; Marx et al., 1988; Greene, 1992; Herrmann & Joger, 1995, 1997; Herrmann et al., 1999; Lenk et al., 2001).

Actualmente, se reconoce la existencia de tres subfamilias hermanas distribuidas por Eurasia, África y América (T.T.R.D., 2008):

- i) Azemiopinae, con sólo una especie (*Azemiops feae*), en el sudeste asiático;
- ii) Crotalinae, con 28 géneros (*Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Calloselasma*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Cryptelytrops*, *Deinagkistrodon*, *Garthius*, *Gloydius*, *Hypnale*, *Lachesis*, *Ophryacus*, *Ovophis*, *Parias*, *Popeia*, *Porthidium*, *Peltopeltor*, *Protobothrops*, *Sistrurus*, *Triceratolepidophis*, *Trimeresurus*, *Tropidolaemus*, *Viridovipera* y *Zhaoermia*) en Europa oriental, Asia y América;
- iii) Viperinae, con 14 géneros (*Adenorhinos*, *Atheris*, *Bitis*, *Causus*, *Cerastes*, *Daboia*, *Echis*, *Eristicophis*, *Macrovipera*, *Montatheris*, *Montivipera*, *Proatheris*, *Pseudocerastes* y *Vipera*), en Eurasia y África.

Los miembros de Crotalinae son conocidos como “**víboras de fosetas**” (*pitvipers*) por presentar fosetas termorreceptivas entre la zona rostral y el ojo, mientras que *Azemiops feae* (subfamilia Azemiopinae) y los miembros de Viperinae se conocen como “**víboras verdaderas**” (*true vipers*) y no tienen fosetas termorreceptivas (Zug et al., 2001; Mallow et al., 2003). *Azemiops feae* presenta los caracteres más ancestrales dentro de los Viperidae y por lo tanto es considerada como la especie más primitiva (Zug et al., 2001). Se sospecha que la subfamilia Viperinae pudo haberse originado a partir de víboras del género *Causus*, segundo género de víboras con elevada presencia de caracteres ancestrales, que también es considerado por varios autores como una rama basal de los Crotalinae (Cadle, 1992; Herrmann & Joger, 1995, 1997; Lenk et al., 2001).

Diversos trabajos sugieren que la familia Viperidae se diferenció en el continente africano y que, posteriormente, colonizó Eurasia y América (Rage, 1987; Greene, 1992; Lenk et al., 2001). En el Oligoceno (hace unos 34 m.a.) África y Europa estaban separadas por el mar de Tetis, lo que impediría la colonización de Eurasia y América por parte de los vipéridos (Rage, 1987; Crespo, 2001; Szyndlar & Rage, 2002). Más tarde, durante el Mioceno (hace 23 m.a.), las dos placas se fusionaron permitiendo que un grupo de víboras (*Daboia*, *Eristicophis*, *Macrovipera*, *Pseudocerastes* y *Vipera*) se dispersase por Eurasia a través del Próximo Oriente (Ineich, 1995; Rage, 1987; Herrmann & Joger, 1997; Lenk et al., 2001), por lo que esta región se considera el centro de radiación de los Viperinae (Barbadillo et al., 1997). Así, desde principios del Mioceno el grupo *Vipera* se establece en Europa, *Montivipera* y *Macrovipera* en Oriente Medio y *Daboia* en el Norte de África (Lenk et al., 2001; Garrigues et al., 2005). En cuanto a la subfamilia Crotalinae, se cree que sus primeros miembros se originaron en un hábitat de estepas y que se dispersaron desde Asia hasta el continente americano vía estrecho de Bering (Greene, 1992, 2003).

4.2 La familia Viperidae en Europa

En Europa, la familia Viperidae está representada por 19 especies, incluyendo una especie de Crotalinae (*Agkistrodon halys*, sólo conocida en el estuario del río Volga, suroeste de Kazajistán) y 18 especies de Viperinae (Gasc et al., 1997; Mallow et al., 2003; Garrigues et al., 2005):

i) dos especies de *Macrovipera*:

- 1) *Macrovipera lebetina* (en el suroeste de Rusia);
- 2) *Macrovipera schweizeri* (en las islas griegas de Milos, Syphnos, Kimolos y Polynos);

ii) tres especies de *Montivipera*:

- 1) *Montivipera raddei*, en el este de Armenia;
- 2) *Montivipera wagneri*, en el sureste de Armenia;
- 3) *Montivipera xanthina*, en varias islas griegas en el mar Egeo y Turquía europea;

iii) trece especies de *Vipera* (Fig. 6):

- 1) *Vipera ammodytes*, desde Austria e Italia hasta los Balcanes, Grecia y la parte europea de Turquía;
- 2) *Vipera aspis*, en el noreste de España, centro y sur de Francia, centro, sur y oeste de Suiza, e Italia, incluyendo las islas de Sicilia y Elba;
- 3) *Vipera berus*, en casi todo el centro y norte de Europa, exceptuando la península Ibérica, el suroeste de Francia y el centro y sur de Italia;
- 4) *Vipera dinniki*, solo en el Cáucaso occidental y septentrional;
- 5) *Vipera eriwanensis*, en el Cáucaso en Armenia y el oeste de Azerbaiyán;
- 6) *Vipera kaznakovi*, desde el sur del Cáucaso hasta el mar Negro;
- 7) *Vipera latastei*, en casi toda la península Ibérica, excepto la franja más septentrional;
- 8) *Vipera lotievi*, en el gran Cáucaso en Rusia;
- 9) *Vipera nikolskii*, en Ucrania y el centro de Rusia;
- 10) *Vipera pontica*, sureste de Georgia;
- 11) *Vipera renardi*, en el este de Europa: Ucrania, Rusia, Azerbaiyán, Kazajistán y Kirguistán;
- 12) *Vipera seoanei*, en el norte de la península Ibérica, penetra unos kilómetros en el suroeste de Francia;
- 13) *Vipera ursinii*, en pequeñas poblaciones aisladas en el sureste de Francia y centro de Italia, en Hungría, en Bosnia-Herzegovina, Croacia, Montenegro, Macedonia y norte de Albania, en Rumanía y en Grecia.

4.3 El género *Vipera* en Europa - taxonomía

Las especies del género *Vipera* distribuidas en Europa se conocen como “víboras europeas”; constituyen un grupo monofilético, hermano de los grupos que componen las llamadas víboras orientales (géneros *Macrovipera* y *Montivipera*) y las víboras asiáticas-norteafricanas (género *Daboia*) (Lenk et al., 2001; Garrigues et al., 2005). Se trata de serpientes de pequeño tamaño, cuerpo robusto, cabeza bien diferenciada del cuerpo y cola proporcionalmente corta. Presentan escamas dorsales carenadas y existe una fuerte tendencia para la fragmentación de las placas cefálicas. La

escama preanal es simple y las escamas subcaudales están dispuestas en dos series. Los ojos poseen pupila vertical y están separados de las escamas supralabiales por una o más hileras de pequeñas escamas. Los machos poseen hemipenes globulosos y bifurcados, con un pedúnculo corto y liso, y presentan gruesas espinas en la base del cuerpo (Braña, 1997a).

El número de grupos que compone las actuales víboras europeas, así como los integrantes y las relaciones filogenéticas existentes entre ellos, ha variado bastante en los últimos 30 años.

Los primeros análisis morfológicos y ecológicos realizados durante las décadas de los 70-80 del siglo pasado (ej. Saint-Girons, 1978, 1980), resultaron en la distinción de tres grupos: *berus-seoanei*, *ursinii* y *aspis-ammodytes-latastei*. De acuerdo con Saint-Girons (1978) en la secuencia: *Vipera ursinii* – *V. kaznakovi* – *V. seoanei* – *V. berus* – *V. aspis* – *V. latastei* – *Vipera ammodytes* existe un aumento progresivo de escamas apicales, ventrales e intercantales + intersupraoculares. Además, el hocico tiende progresivamente a ser más elevado, la forma de la cabeza se hace cada vez más triangular y el cuerpo más robusto (Fig. 7).

Posteriormente, Saint-Girons en 1980 mediante análisis morfológico de los mismos caracteres anteriores e incorporando datos ecológicos (características latitudinales y tipos de hábitat) identifica tres grupos de víboras: *ursinii*, *berus-seoanei* y *aspis-ammodytes-latastei*. De acuerdo con Saint-Girons (1980) las víboras de cada uno de los grupos ocuparían diferentes latitudes y tipos de hábitat:

- i) *berus-seoanei* distribuida septentrionalmente, localizada en las zonas más altas en hábitats húmedos y frescos de los bosques templados;
- ii) *ursinii* con una distribución latitudinal intermedia, pero localizada en las zonas elevadas de las regiones alpinas de Europa occidental (por ejemplo 2000 m en los Alpes), ocupando los hábitats secos de las estepas de Europa Oriental;
- iii) *aspis-ammodytes-latastei* con distribución meridional, y de forma general localizándose en las zonas de menor altitud, en hábitats secos y cálidos de los bosques mediterráneos.

El análisis de los venenos por inmuno-electroforesis de seis especies de *Vipera*, demostró una elevada afinidad entre *Vipera latastei* y *Vipera aspis* (71% de antígenos comunes) y *Vipera ammodytes* (61%), y una menor afinidad con *Vipera berus* (53%) (Saint-Girons & Detrait, 1978). *Vipera seoanei* presenta una elevada afinidad con *Vipera berus* (71%), y en menor escala con *Vipera aspis* (65%) y *Vipera ammodytes* (50%) (Saint-Girons & Detrait, 1978). Estos resultados refuerzan las conclusiones de los trabajos basados en la morfología y ecología (Saint-Girons, 1978, 1980), distinguiendo también tres grupos de víboras en Europa Occidental: *ursinii*, *berus-seoanei* e *aspis-ammodytes-latastei*.

Figura 7. Tendencias evolutivas del grupo *Vipera* de acuerdo con datos morfológicos. Adaptado de Saint-Girons 1978.

Un análisis altitudinal y latitudinal, incluyendo también características ecológicas, de las víboras de Europa y las regiones adyacentes de Próximo Oriente y Norte de África llevada a cabo por G. Nilson y C. Andrén (1997) reconoce la existencia de cuatro grupos (Fig. 8), incluyendo dos complejos de víboras europeas con diferentes preferencias climáticas y estrategias reproductoras:

- i) el complejo “*Pelias*”, incluye a las especies de carácter eurosiberiano, como *V. berus*, *V. dinniki* y *V. kaznakovi*, y también a las especies de las estepas, como *V. ursinii*, en las que la espermatogénesis es de tipo primaveral y, por lo tanto, sólo existe un período de acoplamiento, de tipo primaveral, y que además, es posterior a la muda;
- ii) el complejo “*Vipera I*”, incluye a las especies de carácter mediterráneo, como *V. ammodytes*, *V. aspis* y *V. latastei*, en las que existen dos períodos de acoplamiento anual, uno en primavera y otro en otoño, porque la espermatogénesis de los machos es de tipo mixto, esto es, el esperma se empieza a producir en otoño y continua hasta la primavera del año siguiente.

Sin embargo, esta congruencia entre preferencias biogeográficas y tipo de reproducción no se da en todas las víboras europeas. Algunas especies eurosiberianas del grupo *Pelias*, como es el caso de *V. seoanei*, muestran una espermatogénesis de tipo mixto, mientras que, en algunas subespecies de *V. ammodytes*, se sospecha una espermatogénesis de tipo primaveral (Nilson & Andrén, 1997).

Figura 8. Distribución de los grupos de víboras de Europa, Próximo Oriente y Norte de África de acuerdo con un gradiente de altitud y latitud. Adaptado de Nilson & Andren 1997.

En la actualidad, en base a estudios moleculares de secuencias de ADN mitocondrial, se distinguen tres grupos o clados dentro de las víboras europeas (Fig. 9) (Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006a,b, 2008; Barbanera et al., 2009):

- i) el clado *ammodytes*, que incluye a *V. ammodytes* que comprende siete subclados;
- ii) el clado *aspis*, que incluye a *V. aspis* (que cuenta con cuatro subclados), *V. latastei* y *V. monticola* (restringida al Alto Atlas, Marruecos);
- iii) el clado *Peliás*, que se divide en dos subclados:
 - subclado *Peliás*, que incluye a *V. berus*, *V. dinniki*, *V. kaznakovi*, *V. nikolskii*, *V. pontica* y *V. seoaneii*;
 - subclado *Acridophaga*, que incluye a *V. eriwanensis*, *V. lotievi*, *V. renardi* y *V. ursinii*;

4.4 Origen y evolución de las víboras europeas

En Europa, los registros más antiguos de Viperinae se conocen desde principios del Mioceno (23.8 m.a.) y corresponden a dos fósiles de víboras de tipo *aspis* encontrados en Alemania y Francia (Szyndlar & Rage, 1999, 2002). En la transición al Mioceno medio se produce la invasión de una nueva comunidad de ofidios provenientes del Este (colúbridos modernos, elápidos y víboras orientales -grupo de víboras “grandes” de tipo *Macrovipera*-), coincidente con el máximo térmico observado en Europa (Szyndlar & Rage, 1999, 2002). Este calentamiento del clima, y probable-

Figura 9. Cladograma que representa los principales clados dentro de las víboras europeas. Adaptado y modificado de Garrigues et al. 2005.

mente la competencia con los nuevos ofidios provenientes del este, debió provocar una gran regresión de víboras tipo *aspis*, pues no aparecen fósiles de este grupo en Europa durante este período (Szyndlar & Rage, 1999, 2002).

Según atestigua el registro fósil, durante finales del Mioceno-Plioceno coexistieron en Europa los dos grupos de víboras: el grupo de víboras “grandes”, con distribución meridional y oriental, y un grupo de víboras “pequeñas”, del tipo *aspis*, con distribución septentrional y occidental, ocupando también el norte de África -donde hay fósiles desde mediados del Mioceno, 17.0-11.1 m.a.- (Szyndlar & Rage, 2002). Las víboras “grandes” se convirtieron durante el Plioceno en las serpientes más comunes en gran parte del continente (Szyndlar & Rage, 2002). Sin embargo, la progresiva continentalización del clima del continente europeo ocurrida durante finales del Plioceno-Pleistoceno, redujo drásticamente el número de especies de ofidios, incluyendo las víboras “grandes”; de hecho, hoy en día en Europa, el género *Macrovipera* sólo está representado por dos especies en el extremo sureste (Gasc et al., 1997).

Fue a finales de la década pasada cuando se propuso un escenario hipotético sobre la evolución de las víboras europeas occidentales en base a datos morfológicos, biogeográficos y ecológicos (Fig. 10) (Saint-Girons, 1980). En este escenario se relacionaba la actual distribución de las especies con los eventos geológicos y climáticos ocurridos en Europa durante el Cuaternario.

Figura 10. Esquema hipotético de la evolución de las víboras europeas occidentales (género *Vipera*) durante el Cuaternario, descrito por Saint-Girons 1980. A) Plioceno superior: diferenciación/expansión de los precursores de *berus*, *ursinii*, *aspis-ammodytes-latastei* (AAL); B) Pleistoceno inferior: expansión meridional y occidental de *V. berus* (VBE), expansión occidental de *V. ursinii* (VUR), contracción de las áreas de distribución de *V. latastei* (VLA), *V. aspis* (VAS) y *V. ammodytes* (VAM), diferenciación de las subespecies de *V. latastei* y *V. aspis*; C) Pleistoceno superior: diferenciación de *V. monticola* (VMO) y *V. seoanei* (VSE), contracción del área de *V. berus* (VBE) en el Norte de Europa y *V. l. gaditana* (VLG) en el Norte de África, fragmentación del área de *V. ursinii* (VUR) y expansión de *V. latastei latastei* (VLL), las subespecies de *V. aspis* (VAA: *V. aspis aspis*, VAAT: *V. aspis atra*, VAF: *V. aspis francisciredi*, VAH: *V. aspis hugyi*, VAZ: *V. aspis zinnikeri*) y *V. ammodytes* (VAM).

Actualmente, el uso de técnicas moleculares ha permitido una mayor comprensión de la evolución de varios miembros del grupo *Vipera* en Europa (ej. Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006a,b, 2008; Barbanera et al., 2009). La diversificación de las víboras europeas, así como su distribución parapátrica, parecen resultado de procesos de especiación alopátrica ocurridos durante finales del Plioceno y Pleistoceno (Saint-Girons, 1980; Hewitt, 1996; Taberlet et al., 1998). Sin embargo, aún estamos lejos de poder componer un escenario biogeográfico de evolución e interacción de las diversas formas de *Vipera* en Europa, tal y como Saint-Girons esquematizó en 1980. Por eso, a continuación, resumo por clados, los últimos trabajos sobre origen y evolución de los miembros del género en Europa.

Clado *aspis* - *V. aspis*, *V. latastei* y *V. monticola*.

De mediados del Plioceno (4.5-2.8 m.a.) data ya una primera diferenciación dentro del ancestro de *V. aspis* en dos clados, uno en el oeste y el otro en el este, separados por la cordillera de los Alpes (Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006a). El progresivo enfriamiento del clima y la expansión de los vipéridos septentrionales del grupo *Pelias* (*Vipera berus-seoanei-ursinii*) provenientes del este probablemente fragmentan la distribución continua del clado *aspis*, llevándolo a su contracción en refugios en el sur de Europa durante el Pleistoceno (Szyndlar & Rage, 1999, 2002; Ursenbacher et al., 2006b).

Durante los primeros periodos glaciares del Pleistoceno, periodo de Donau (hace unos 2.2-1.4 m.a.), *V. aspis* fue restringida al sur de Europa refugiándose el clado del oeste en la península Ibérica y sur de Francia, y el clado del este en Sicilia (Ursenbacher et al., 2006a; Barbanera et al.,

2009). En el siguiente período post-glaciario, las nuevas formas de *Vipera aspis* se debieron expandir hacia el norte, recolonizando Europa desde sus refugios de la península Ibérica (subclado *zinnikeri*) y sur de Francia (subclado *aspis*), y Sicilia (subclado *francisciredi-hugyi*) (Ursenbacher et al., 2006a; Barbanera et al., 2009). En su avance desplazaron y aislaron a las especies del grupo *Pelias*. Una segunda contracción de las distribuciones de *V. aspis* debió suceder durante el período glaciario de Gunz (hace unos 1.5-1.2 m.a.); en este período parece claro el subclado *francisciredi-hugyi* se refugió tanto en Sicilia como en el sur de la península Itálica (Barbanera et al., 2009). Durante el período glaciario de Mindel (0.8-0.6 m.a.), finales del Pleistoceno, las distribuciones de las especies de *Vipera* fueron nuevamente restringidas a nuevos refugios en el sur de Europa. Las poblaciones de *V. aspis* italianas parecen haberse refugiado en tres zonas en Italia: Sicilia y sur de la península Itálica (subclado *hugyi*) y norte de Italia (subclado *francisciredi*) (Barbanera et al., 2009). Al igual que durante el período de Gunz, se desconoce que refugios utilizaron los otros clados (*zinnikeri* y *aspis*), pero probablemente fueron los mismos que durante el período de Donau.

Desde estos refugios los cuatro subclados volverán a expandirse hacia el norte (y sur en el caso de *francisciredi*) hasta alcanzar la distribución parapátrica que muestran las cuatro subespecies en la actualidad, con amplias zonas de contacto e intercambio genético, siendo muy patente existente entre las subespecies *francisciredi* y *hugyi* (Zuffi et al., 2001; Barbanera et al., 2009).

La historia evolutiva de los otros dos integrantes del clado *aspis*, *V. latastei* y *V. monticola*, todavía permanece desconocida. Aunque probablemente se debieron diferenciar del resto de miembros del clado *aspis* entre el Mioceno-Plioceno (Saint-Girons, 1980; Lenk et al., 2001), todavía no se han realizado estudios genéticos que eluciden su filogeografía; no obstante, parece claro que los eventos geológicos ocurridos en el macizo Bético-Rifereño han jugado un papel muy importante en la formación de estas especies (ver Pleguezuelos et al., 2008).

Clado *ammodytes* - *V. ammodytes*

Parece que el ancestro de *V. ammodytes* (víboras de tipo *aspis*) colonizó los Balcanes durante el Mioceno (Szyndlar & Rage, 1999, 2002; Ursenbacher et al., 2008), pero en el registro fósil no existen víboras similares hasta finales del Plioceno en el norte de los Cárpatos (Szyndlar, 1984).

Ursenbacher et al. (2008) sugieren una separación del grupo *ammodytes* en cuatro clados en el Mioceno temprano; no obstante, los análisis son incapaces de determinar donde ocurrió este evento. De los siete clados en total que reconocen estos autores, las diferenciaciones principales ocurrieron durante el Plioceno, mientras que las glaciaciones del Cuaternario sólo influenciaron la diversidad genética dentro de éstos. Así, por ejemplo, la divergencia entre los clados de las Cícladas

y el Peloponeso (4.4-2.6 m.a) coincide con el aislamiento entre el Peloponeso, las islas Cícladas centrales y la Grecia continental ocurrido hace unos 3 m.a. (Ursenbacher et al., 2008).

Al igual que ocurrió probablemente con *V. aspis* (Szyndlar & Rage, 1999), la competencia con los miembros del grupo *berus*, mejor adaptados a bajas temperaturas y que expandieron su distribución durante el Pleistoceno, influyó la fragmentación de las poblaciones de *V. ammodytes* en varios refugios. Tras las glaciaciones *V. ammodytes* se volvió a expandir hacia el norte, ocupando su distribución actual y desplazando a los miembros del clado *berus* (Ursenbacher et al., 2008).

Clado *berus* - subclados *Pelias* y *Acridophaga*

Aunque el grupo *berus* aparece representado ya en los fósiles del Mioceno en la zona más norte de Europa, es durante la transición Plioceno superior – Pleistoceno inferior (hace unos 2 m.a.) cuando aparecen los primeros registros en la zona noroeste y central de Europa occidental (Szyndlar & Rage, 2002). En esta época el clado *berus* ya se había diferenciado en dos sub-clados, uno con especies adaptadas a zonas frescas y húmedas (sub-clado *Pelias*, grupo *berus*) y otro con especies adaptadas a zonas esteparias (sub-clado *Acridophaga*, grupo *ursinii*) (Nilson & Andren, 2001; Ursenbacher et al., 2006b).

Durante el Pleistoceno inferior, *V. berus*, que ya se había extendido por Europa (y había penetrado por los Pirineos, empezando su diferenciación como *V. seoanei*), tuvo que verse obligada a migrar hacia el sur, utilizando los refugios del norte de las penínsulas Balcánica e Itálica, y hacia el este, refugiándose en una región indeterminada cerca de los Cárpatos. No obstante, se reconoce la existencia de tres clados dentro de *V. berus*: el clado italiano, el balcánico y el del norte, que a su vez incluye cuatro sub-clados (el subclado de Cárpatos, el del este, centro y oeste de Europa) (Ursenbacher et al., 2006b).

También *V. ursinii*, que ya se había extendido por el sur de Francia y centro de Italia, se debió restringir a varios refugios en el sur. Parece ser que fue durante esta época cuando las poblaciones más occidentales de *V. ursinii* se empezaron a adaptar a las condiciones alpinas que muestran en la actualidad (Nilson & Andren, 2001). Estas migraciones latitudinales desplazaron a *V. aspis* y a *V. ammodytes* relegándolas a los refugios ya relatados. Cabe destacar la ausencia de *V. berus* en la península Ibérica, debida seguramente a *V. seoanei*, quien también debió migrar hacia el sur, desplazando a *V. latastei*, y utilizando probablemente dos refugios (según sugiere la existencia de dos subespecies).

Tras las glaciaciones los miembros del clado *berus* migran latitudinalmente hacia el norte (siendo excluidos por las víboras mediterráneas), quedando, en muchos casos confinados en macizos montañosos como por ejemplo el Macizo central francés (Ursenbacher et al., 2006b).

4.5 Zonas de contacto entre las distribuciones de las víboras europeas

La distribución actual de las víboras europeas es de tipo parapátrico (Saint-Girons, 1980), esto es, las áreas de distribución de las diferentes especies son contiguas y prácticamente no se superponen (Brown & Lomolino, 1998). Sin embargo, diversos estudios han revelado la existencia de zonas de contacto entre las distribuciones de varias especies de *Vipera*, donde se sospecha que existe una distribución simpátrica, es decir, coexistencia de dos o más especies en un determinado área (Tabla 2).

La mayoría de las especies de víboras europeas, exceptuando el subgrupo *Acridophaga* (*V. ursinii*), tienen similares requerimientos ecológicos, por lo que cuando se sospecha una coexistencia en el mismo local se presupone una situación de elevada competencia interespecífica que, bien puede llevar a la exclusión competitiva, o bien puede llevar a la diferenciación de nicho.

Los estudios realizados muestran que, de manera general, en las zonas de contacto no existe simpatría estricta, es decir, sintopía o coexistencia a escala local. Normalmente la aparente distribución simpátrica en las zonas de contacto es debida a un artefacto de la escala con la que representamos la distribución (ej. cuadros UTM de 50x50 km, Gasc et al., 1997; cuadros UTM de 10x10 km, Pleguezuelos et al., 2002). Cuando enfocamos en las zonas de contacto a una escala local (cuadros UTM 1x1 km o menor) se comprueba que las especies se distribuyen de forma alopátrica, es decir, seleccionan hábitats con distintas condiciones micro-climáticas (Reinert, 1984a,b; Brito & Crespo, 2002; Guisan & Hofer, 2003; Luiselli, 2006). Así, por ejemplo, en el Macizo central francés donde contactan *V. aspis* y *V. berus* (Duguy & Saint-Girons, 1978), las dos especies se segregan en función de la altitud, mientras que en las montañas de los Balcanes, donde contactan *V. ammodytes*, *V. berus* y *V. ursinii* (Saint-Girons, 1980), la primera especie selecciona las zonas rocosas bien soleadas, la segunda los valles más frescos, zonas de turbera y orlas de bosques, y la tercera los prados subalpinos. Otro ejemplo de selección de hábitat diferente se produce en las zonas de contacto del noreste de Italia donde contactan *V. ammodytes*, *V. aspis* y *V. berus*, la primera selecciona las zonas rocosas, la segunda las zonas secas y soleadas, y la tercera las áreas forestadas y frías (Lapini, 1983). Recientemente ha sido estudiado un caso de simpatría entre *V. aspis* y *V. ursinii* en una banda comprendida entre los 1650 - 1900 m.s.n.m. en Gran Sasso - Abruzzo, macizo central italiano- (Luiselli et al., 2007): aparte de las típicas diferencias en el nicho trófico y en la morfología que presentan las dos especies (tanto en esta área, como en el resto de sus rangos de distribución), realmente no coexisten.

En la actualidad sólo han sido constatados unos pocos casos de simpatría entre víboras europeas. Los dos casos más conocidos, y sobre los que se ha investigado en profundidad, ocurren entre *V. aspis* y *V. berus*, el primero en la región del Loira atlántico -Nantes, oeste de Francia- (Saint-

Tabla 2. Estudios realizados en las zonas de contacto entre las distribuciones de las víboras europeas occidentales: *V. ammodytes* (VAM), *V. aspis* (VAS), *V. berus* (VBE), *V. latastei* (VLA), *V. seoanei* (VSE) y *V. ursinii* (VUR).

Especies	Región, país	Distribución local	Simpatría	Sintopía	Selección del hábitat	Diferencias ecológicas	Ejemplares intermedios	Autores
VAM-VAS-VBE	Noreste, Italia	?	?	?	diferente	?	?	Lapini, 1983
VAM-VBE-VUR	Balcanes, Italia, Eslovenia y Croacia	?	?	no	diferente	?	no	Saint-Girons, 1980
VAS-VBE	Macizo central, Francia	Alopátrica	no	no	diferente	?	no	Duguy & Saint-Girons, 1978
VAS-VBE	Zona pre-alpina, Suiza	Alopátrica	en 70 ha	si	diferente	Actividad anual y reproductora, y demografía	no	Monney, 1996
VAS-VBE	Loira Atlántico, Francia	Alopátrica	en 1-2 km	no	diferente	Actividad anual y reproductora, y demografía	no	Saint-Girons, 1975
VAS-VLA	Sur de los Pirineos, España	Alopátrica	en 10 km	no	diferente	?	si	Duguy et al. 1979
VAS-VLA	Sistema Ibérico, España	?	?	no	?	?	no	Duguy et al. 1979; Barbadillo, 1983
VAS-VLA-VSE	Alto Ebro, España.	?	?	no	?	?	no	Duguy et al. 1979; Barbadillo, 1983
VAS-VUR	Gran Sasso, Abruzzo, Italia	Alopátrica	si	?	diferente	Composición de la dieta	no	Luiselli et al., 2007
VAS-VSE	País Vasco y Pirineos atlánticos, España	Alopátrica	no	no	diferente	?	si	Duguy et al. 1979; Bea, 1985
VLA-VSE	P.N. Peneda-Gerês, Portugal	Alopátrica	no	no	diferente	Actividad reproductora	no	Brito & Crespo, 2002

Girons, 1975), donde las dos especies habitan a lo largo de una estrecha banda de uno o dos kilómetros, el segundo en Oberland bernois – región pre-alpina, oeste de Suiza- (Monney, 1996), donde ambas especies coexisten en una pequeña área de 70 ha entre los 1.400 - 1.800 m.s.n.m. En ambos casos parece que no existe una auténtica coexistencia o una sintopía estricta: en el caso del

Loira atlántico lo que ocurre es una superposición de poblaciones y en el caso de la región prealpina suiza lo que sucede es que ambas especies comparten una zona con gran densidad de presas (Saint-Girons, 1975; Monney, 1996).

Como he relatado anteriormente, la competencia interespecífica seguramente ha jugado un papel muy importante en la reciente historia evolutiva del grupo de las víboras europeas (Saint-Girons, 1980). La competencia interespecífica es un fenómeno transitorio y muy difícil de observar en la naturaleza, ya que se pierde la evidencia de que ha ocurrido cuando desaparece uno de los competidores (Ricklefs, 1998). No obstante, Saint-Girons (1975) ha puesto en relieve la existencia de diferencias en la fecundidad y supervivencia entre las poblaciones de *V. aspis* y *V. berus* de la zona de contacto del Loira Atlántico, atribuibles a interacciones competitivas. Estas diferencias también han sido encontradas por Monney en 1996 entre *V. aspis* y *V. berus* en la zona de contacto de la región pre-Alpina suiza, quien además ha probado la existencia de competencia interespecífica entre las dos especies.

En resumen, en las zonas de contacto no parece existir coexistencia entre las víboras europeas. Los dos casos de coexistencia son anecdóticos, ya que ocurren en zonas con escasa extensión. Sin embargo, en los dos casos la competencia interespecífica parece tener repercusiones en las dinámicas poblacionales de ambos vipéridos. De forma general, el principal mecanismo que lleva a los vipéridos europeos a evitar la competencia interespecífica en las zonas de contacto parece ser la segregación espacial (Luiselli, 2006).

El actual conocimiento sobre las zonas de contacto entre las distribuciones de las víboras europeas es muy escaso si lo comparamos con la multitud de zonas de contacto que parecen existir (Fig. 11). Muchos de los estudios existentes son de tipo descriptivo (ej. Duguy et al., 1979; Bea, 1985), siendo necesarios estudios en profundidad, que analicen de manera cuantitativa, la distribución de las víboras en la zona de contacto a escala local, así como los factores ambientales y ecológicos que intervienen en ésta (ej. Monney, 1996; Brito & Crespo, 2002; Luiselli et al., 2007).

Debido a que estos estudios versan sobre especies pertenecientes a diferentes clados (ej. *aspispelias*, Saint-Girons, 1975; Monney, 1996; Brito & Crespo, 2002; *aspis-acridophaga*, Luiselli et al., 2007), se desconoce qué ocurre cuando dos especies de víboras hermanas (pertenecientes al mismo clado) establecen contacto. Los requerimientos ecológicos entre especies hermanas son tan parecidos que la competencia interespecífica en las zonas de contacto ha de ser muy elevada y ha de tener profundas repercusiones en las dinámicas poblacionales de ambos vipéridos.

Se desconoce también, cuáles son las dinámicas de estas zonas de contacto en cuanto a aislamiento reproductor y flujo genético, tanto en el caso de especies de diferente, como del mismo clado. Aunque la hibridación natural entre especies de víboras parece ser anecdótica (Saint-Girons,

Figura 11. Áreas de potencial simpatria entre las especies de víboras europeas occidentales: *V. latastei* - *V. seoanei* (A), *V. aspis* - *V. seoanei* (B), *V. aspis* - *V. latastei* (C), *V. aspis* - *V. latastei* - *V. seoanei* (D), *V. aspis* - *V. berus* (E, F), *V. aspis* - *V. ursinii* (G, I), *V. ammodytes* - *V. aspis* - *V. berus* (H), *V. ammodytes* - *V. berus* (J, N), *V. ammodytes* - *V. berus* - *V. ursinii* (L, M, Ñ), *V. ammodytes* - *V. ursinii* (K). Adaptado de Gasc et al. 1997.

1975, 1980; Monney, 1996), cuando ocurre, los híbridos normalmente no producen descendencia viable y/o fértil (ej. *V. ammodytes* x *V. aspis* en el sur de Tirol; *V. ammodytes* x *V. berus* en Corintia y en Rumanía; Kreiner, 2007). Sin embargo, esto no ocurre en condiciones de cautividad, en las que se pueden obtener híbridos fértiles, que producen descendencia viable y fértil (ej. *V. ammodytes* x *V. aspis*, Obermayer, 1967; *V. aspis* x *V. seoanei*, Saint-Girons, 1977, 1990a,b). Esto sugiere que los mecanismos de aislamiento reproductor son exitosos entre especies de diferentes clados, donde la hibridación natural falla, pero se desconoce qué sucede cuando contactan especies hermanas.

4.6 Zonas de contacto entre las víboras ibéricas

En relación a la península Ibérica, un análisis a escala regional (en base cuadrículas UTM de 10x10km²) de las distribuciones de las tres especies de víboras ibéricas (*V. aspis*, *V. latastei* y *V. seoanei*), realizado a partir de los trabajos de Pleguezuelos et al. (2002) y Loureiro et al. (2008), identifica varias zonas de contacto (Fig. 12):

- i) *Vipera seoanei* y *Vipera latastei* contactan en varias zonas en el noroeste y norte de la península Ibérica, como por ejemplo en las montañas del Gerés (norte de Portugal), en el sur de la provincia de Ourense (España), en la región de Sanabria (España) y varias zonas al sur de la cordillera Cantábrica (España);
- ii) *Vipera seoanei* y *Vipera aspis* contactan a lo largo de una amplia banda que va desde el norte al noreste de la península Ibérica, como por ejemplo en el este de Santander-norte de Burgos (España), sur del país Vasco (España), el norte de Navarra (España) y en los Pirineos Atlánticos (España y Francia);
- iii) *Vipera aspis* y *Vipera latastei*, contactan en una amplia zona en el noreste de España, incluyendo aquí las zonas de contacto de la provincia de Burgos y el Sistema Ibérico, así como cuatro zonas al sur de los Pirineos, como Sierra de la Peña (Navarra-Huesca), la región de Sobrarbe (Huesca), la región de Pallars (Lleida) y la región del Moianés (Barcelona);
- iv) *Vipera aspis*, *Vipera latastei* y *Vipera seoanei* contactan en el Alto curso del río Ebro, entre el sur de Santander y el noroeste de Burgos, en el Norte de España.

Los estudios existentes sobre zonas de contacto entre las especies más alejadas filogenéticamente, *aspis-seoanei* (Bea, 1985) y *latastei-seoanei* (Brito & Crespo, 2002), revelan que, a escala local, cada par de especies se distribuye de manera alopátrica. En ambos casos existe una selección de hábitats diferente: *V. seoanei* utiliza las zonas más húmedas, expuestas al norte y con mayor cobertura vegetal cuando contacta con *V. aspis* (Bea, 1985), mientras que utiliza las zonas más altas, con menor insolación, menor cantidad de rocas y con mayor cobertura vegetal cuando contacta con *V. latastei* (Brito & Crespo, 2002).

No existe ningún estudio local sobre alguna de las zonas de contacto entre el par más cercano filogenéticamente, *aspis-latastei*, sólo un estudio a gran escala sobre todo el área de contacto (Duguy et al., 1979). Este estudio describe además la zona de contacto de la Sierra de la Peña, donde ambas especies contactan a lo largo de una banda de unos 10 km con dirección oeste-este, entre los 400 y los 1.200 m de altitud. Al igual que en otras zonas de contacto, ambas especies parecen segregarse en función de los factores climáticos, puesto que *V. aspis* ocupa las zonas más húmedas expuestas al norte, mientras que *V. latastei* utiliza las zonas secas y cálidas expuestas al sur, con lo que no parece existir coexistencia (Duguy et al., 1979). Estos autores también describen

Figura 12. Áreas de distribución y zonas de simpatria a escala UTM 10x10 km de las tres especies de víboras ibéricas. Las zonas de simpatria aparecen señaladas con la superposición de los símbolos para cada especie. Adaptado de Pleguezuelos et al. 2002, Brito & Crespo 2002 y Loureiro et al. 2008.

la existencia de convergencia morfológica entre las diferentes especies en los Pirineos, es decir, la ocurrencia de ejemplares con características morfológicas intermedias entre *aspis-seoanei* y *aspis-latastei* en lo referido a la elevación del hocico y al patrón dorsal (Duguy et al., 1979). De hecho, un reciente estudio sobre variación morfológica en *V. latastei* y *V. monticola* en todo su área de distribución ha señalado la existencia de ejemplares con morfología convergente entre *V. aspis* y *V. latastei* en el Noreste de la península Ibérica (Brito et al., 2008).

Se establecen dos hipótesis para explicar este fenómeno de convergencia morfológica en las zonas de contacto:

- i) que la selección natural conduzca a una adaptación morfológica a las mismas condiciones locales en ambas poblaciones (ver sección 1.2; ej. Malhotra & Thorpe, 1997; Sanders et al., 2004);
- ii) que exista una introgresión genética de una especie en la otra, debido a un proceso de hibridación natural (ver sección 1.5).

Las presiones selectivas, tanto bióticas (interacción con otros organismos), como abióticas (factores ambientales), pueden cambiar a lo largo de los rangos de distribución de las especies y diferentes fenotipos pueden verse favorecidos como la forma más eficiente para explotar las condiciones locales (West-Eberhard, 2003). Como ocurre en muchos otros organismos (Thorpe, 1987),

existe una gran variación geográfica en los rasgos morfológicos de las diferentes especies de *Vipera* (ej. Zuffi, 2002; Brito et al., 2006, 2008); lamentablemente, no existen estudios sobre selección natural en las zonas de contacto.

Respecto a la segunda hipótesis, nunca se han encontrado híbridos en la naturaleza entre *V. aspis* y *V. latastei* y/o *V. seoanei* (Saint-Girons & Duguy, 1976; Braña, 1978; Duguy et al., 1979; Saint-Girons, 1980; Bea et al., 1984; Brito & Crespo, 2002). Tampoco se han realizado estudios sobre hibridación e introgresión genético en alguna de las zonas de contacto conocidas. Sin embargo, la hibridación sí es posible en condiciones de cautividad, por lo menos entre *V. aspis* y *V. seoanei* (Saint-Girons, 1990a,b). El análisis morfológico de 13 híbridos de las crías de tres hembras (macho *V. aspis* x hembra *V. seoanei*) en cautiverio, muestra que los individuos tienen una apariencia intermedia entre los progenitores: el número de escamas ventrales, escamas subcaudales y de filas de escamas suboculares es próximo al de *V. aspis*, mientras el número de escamas cefálicas y perioculares es próximo al de *V. seoanei* (Saint-Girons, 1990a). Estos híbridos son fértiles, y el análisis de cinco híbridos F2 provenientes de un retrocruzamiento (macho híbrido x hembra *V. aspis*), muestra que los híbridos F2 se parecen más a los híbridos F1 que a *V. aspis* (Saint-Girons, 1990a). La observación en cautividad del comportamiento de cópula de parejas mixtas (macho *V. aspis* x hembra *V. seoanei*), muestra que durante la fase que precede a la cópula, los machos normalmente paran la actividad sexual después de lengüetear sobre el dorso de la hembra (Saint-Girons, 1990b). Esto sugiere la ocurrencia de mecanismos de aislamiento pre-zigótico, como en este caso el reconocimiento sexual, pero que pueden fallar en determinadas ocasiones, como por ejemplo, forzando la cópula en cautividad.

La zona de contacto del Alto curso del río Ebro brinda la oportunidad de obtener nuevos datos que aumenten el escaso conocimiento científico general sobre las poblaciones de las tres especies de víboras ibéricas. Además, es la única en la península que permite elucidar los factores ambientales y ecológicos que intervienen en la biogeografía de dos especies cercanas (*V. aspis* y *V. latastei*) y otra más alejada filogenéticamente (*V. seoanei*). Comparar cómo influyen estos factores a los distintos pares, para corroborar la existencia de una distribución alopátrica a escala local o una posible coexistencia. En caso de coexistencia, identificar qué mecanismos ecológicos exhiben las especies para reducir la competencia interespecífica y si alguna muestra ventajas competitivas sobre las otras. La zona del Alto Ebro también permite estudiar la relación entre variación morfológica y factores ambientales para comprender como afectan las presiones selectivas ambientales a estas especies, así como investigar los mecanismos de aislamiento reproductor para entender la dinámica de una potencial zona híbrida. Toda esta información es esencial para una mejor comprensión de los procesos de especiación alopátrica a partir del cual se han originado estas especies.

ÁREA DE ESTUDIO

STUDY AREA

El área de estudio fue delimitada tras el análisis a escala regional (en base a celdas UTM de $10 \times 10 \text{ km}^2$) de las distribuciones de las tres especies de víboras ibéricas (*V. aspis*, *V. latastei* y *V. seoanei*), realizado a partir del “Atlas y Libro rojo de los Anfibios y Reptiles de España” (Pleguezuelos et al., 2002). Se trataba de delimitar una zona de contacto entre las tres especies y, para ello, se seleccionaron 1.200 km^2 dentro del tramo alto del río Ebro (Alto Ebro), entre el suroeste de la provincia de Santander y el noroeste de la provincia de Burgos (Fig. 1) (latitud: $N42^\circ 37.7' - N42^\circ 58.7'$; longitud: $W3^\circ 37.3' - W3^\circ 58.5'$).

Figura 1. Arriba a la izquierda, localización en la península Ibérica del área de estudio. A continuación, Modelo digital del terreno con las toponimias, carreteras y ríos más importantes del área de estudio. A la derecha, imagen de satélite del área de estudio con los ríos y algunas toponimias.

El Alto Ebro es una zona de transición entre dos áreas con características geológicas, edafológicas y orográficas diferentes, pertenecientes además a distintas regiones bioclimáticas (Rivas-Martínez, 1987):

- i) el **noroeste y norte**, está geológicamente dominado por materiales del Eocretáceo con pequeñas porciones del Triásico y Cuaternario. Edafológicamente está integrado por tierra parca húmeda. Orográficamente está formada por las estribaciones montañosas meridionales de la Cordillera Cantábrica, con montañas de baja altitud ($<1200 \text{ m.s.n.m.}$) y suaves pendientes. Esta zona se engloba dentro de la región Eurosiberiana, presentando tres series climatófilas dentro del piso Montano: i) la serie montana cántabro-euskalduna y pirenaica occidental

acidófila del haya o *Fagus sylvatica* (*Saxifrago hirsutae-Fageto sigmetum*); ii) la serie montana cantabro-euskalduna mesofítica del roble o *Quercus robur* (*Crataego laevigatae-Querceto roboris sigmetum*); iii) la serie montano-colina orocantábrica acidófila del roble melojo o *Quercus pyrenaica* (*Linario triornithophorae-Querceto pyrenaicae sigmetum*);

- 2) el **centro y sur**, está geológicamente caracterizado por materiales del Neocretáceo, con pequeñas porciones del Neocretáceo y Eoceno. Edafológicamente está constituido por tierra con horizonte de humus muy poco desarrollado, asentado sobre suelo pardo calizo. Orográficamente está formado por el borde noreste de las conocidas como “parameras serranas” de la sub-meseta norte, formadas por páramos calizos, también de poca altitud (<1100 m.s.n.m.), excavados por el río Ebro y su afluente, el río Rudrón, dando lugar a profundos cañones. Aunque también tiene relictos del piso montano de la región Eurosiberiana -la serie montana orocantábrica y cantabro-euskalduna basófila y xerófila del haya o *Fagus sylvatica* (*Epipactidi helleborine-Fageto sigmetum*)-, esta zona se engloba dentro de la región Mediterránea, presentando tres series climatófilas dentro del piso Supramediterráneo: i) la serie supra-mediterránea castellano-cantábrica y riojano-estellesa basófila de quejigo o *Quercus faginea* (*Spiraeo-Obovatae-Querceto fagineae sigmetum*) básicamente en los valles; ii) la serie supra-mesomediterránea carpetana occidental, orensano-sanabriense, leonesa húmedo-hiperhúmeda silicícola del roble melojo o *Quercus pyrenaica* (*Holco molli-Querceto pyrenaicae sigmetum*) con *Erica aragonensis* en los páramos más orientales; iii) la serie supra-mediterránea castellano-cantábrica y riojano-estellesa basófila de la encina o *Quercus rotundifolia* (*Spiraeo hispanicae-Querceto rotundifoliae sigmetum*) en los páramos y zonas altas de las laderas.

El rango altitudinal va desde los 590 a los 1256 m.s.n.m. El clima predominante es el Mediterráneo sub-húmedo con tendencia centroeuropea (Font Tullot, 1983), es decir, precipitaciones escasas, ocurriendo principalmente en primavera y otoño, y una importante variación en la amplitud térmica, con temperaturas muy bajas en invierno y muy altas en verano. Sin embargo, la precipitación media anual se incrementa de sur a norte desde los 614 a los 959 mm/año; la temperatura media anual varía entre 22.2 a 24.8 °C, la temperatura mínima media anual entre -2.0 y 0.0 °C, mientras que la temperatura máxima media anual lo hace entre 22.8 y 28.0 °C (Hijmans et al., 2005; SIGA, 2005).

Gráfico 1. Climogramas de las estaciones de Humada (situada al suroeste del área de estudio) y Villarcayo (situada al noreste del área de estudio). Adaptado de JCYL 2001.

Figura 2. Fotografías de la zona de estudio. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: Valle de Valde-
rredible, Valle de Manzanedo, Valdelateja, Cañón del Ebro, inmediaciones de Covanera e inmediaciones de
Mozuelos de Sedano.

La zona de estudio ha sufrido un acusado uso por parte del hombre. La intensa deforestación debida al carboneo ha ocasionado que, en la actualidad, la mayoría de los encinares y muchos quejigares estén desestructurados, estando en fase de regeneración. Por otra parte, la emigración de las gentes del lugar, ocurrida principalmente durante los años 60 del siglo pasado, resultó en el abandono de las tierras de labor (Fig. 3), ocasionando que en la actualidad muchas zonas presenten estados de desarrollo de la vegetación potencial, con vegetación herbácea y matorral (Asociación *Arctostaphylo crassifoliae*-*Genistetum occidentalis*). Además, el territorio ha sido utilizado tradicionalmente para pasto de ganado ovino y bovino (Rivas-Martínez & Loidi, 1999), existiendo muchas zonas con vegetación rala. También hay que destacar el roturado de muchas zonas y su posterior reforestación con coníferas (*Pinus sylvestris*) realizado más recientemente.

Figura 3. A la izquierda foto del Barrio de Nápoles (San Felices de Rudrón, Burgos) durante la primera mitad del siglo pasado. A la derecha la misma zona fotografiada en el año 2004.

En la actualidad, la zona de estudio cuenta con muy poca población humana, siendo Polientes (valle de Valderredible, provincia de Santander) la localidad con mayor número de habitantes (211 habitantes censados en 2008). Las poblaciones con más habitantes dentro de la provincia de Burgos son Soncillo (valle de Valdebezana) con 135 habitantes, Cilleruelo de Bezana (Hoz de Arriba) con 81 habitantes, Sedano (valle de Sedano) con 90 habitantes y Tubilla del Agua con 53 habitantes (INE, 2008). No obstante, se estiman unos 2.7 habitantes por km² (JCYL, 2006). Sin embargo, debido al turismo y al retorno temporal de muchos emigrantes y descendientes de éstos, el número de personas en la zona de estudio se incrementa considerablemente períodos festivos como la Semana Santa y los meses de verano.

Más del 60% de la zona de estudio se encuentra protegida, siendo dos espacios naturales los que más área engloban (JCYL, 2008):

- 1) el “**Monte Hijedo**”, con una extensión de 1.500 Ha., está localizado en la Alfoz de Santa Gadea, al sur del embalse del Ebro, en la provincia de Burgos. Se trata de un bosque mixto de roble albar (*Quercus petraea*) y haya (*Fagus sylvatica*), con grupos dispersos de otras especies arbóreas como tejos (*Taxus baccata*), alisos (*Alnus glutinosa*), abedules (*Betula pendula*), avellanos (*Corylus avellana*), acebos (*Ilex aquifolium*), cornejos (*Cornus sanguinea*) y arándanos (*Vaccinium myrtillus*). También alberga una interesante comunidad faunística entre la que se encuentran especies tan representativas como el pito negro (*Dryocopus martius*), el lobo (*Canis lupus*) o el desmán de los Pirineos (*Galemys pyrenaeus*). Recientemente ha sido declarado LIC (Lugar de Interés Comunitario) dentro de la Red Natura 2000;
- 2) las “**Hoces del Alto Ebro y Rudrón**”, engloba una superficie aproximada de 46.373 Ha., incluyendo total o parcialmente a los términos municipales de Alfoz de Bricia (1.613 Ha.), Los Altos (8.473 Ha.), Basconcillos del Tozo (3.672 Ha.), Sargentos de la Lora (4.640 Ha.), Tubilla del Agua (7.844 Ha.), Valle de Manzanedo (3.570 Ha.), Valle de Sedano (12.278 Ha.), Valle de Valdebezana (2.381 Ha.) y el Valle de Zamanzas (1.902 Ha.). Se trata de un espacio natural constituido por estrechos fondos de valle encajados entre escarpados desfiladeros y cortados, formados por los ríos Ebro y su afluente el río Rudrón, y que contrastan con los extensos páramos casi llanos situados a mayor altitud. Mientras que los valles están más humanizados y muchas zonas de los páramos están explotados agrícola-mente, las hoces tienen un buen nivel de conservación de sus valores naturales, tanto en fauna como en flora. La humedad y umbría de las hoces mantienen unos ricos bosques de ribera y toda la fauna asociada a éstos (aves como el martín pescador -*Alcedo atthis*- o el mirlo acuático -*Cinclus cinclus*-, pequeños mamíferos como el murciélago de ribera -*Myotis daubentoni*- o el de bosque -*Barbastella barbastellus*-, el desmán de los Pirineos -*Galemys pyrenaicus*-, reptiles como el lagarto verdinegro -*Lacerta schreiberi*-, etc.), mientras que sus paredes son propicias para las aves rapaces, (como el buitre leonado -*Gyps fulvus*-, el águila real -*Aquila chrysaetos*-, el águila perdicera -*Hieraetus pennatus*-, el alimoche -*Neophron percnopterus*-, el búho real -*Bubo bubo*-, etc.). Además, los ríos destacan por la presencia del cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes*), la trucha (*Salmo trutta*), la bermejuela (*Chondrostoma arcasii*), el gobio (*Gobio gobio*) y el piscardo (*Phoxinus phoxinus*). Cuenta con varias figuras de protección: LIC (Lugar de Interés Comunitario) y ZEPA (Zona de Especial Protección para las Aves) dentro de la Red Natura 2000, así como

la de Parque Natural, dentro de la Red de Espacios Naturales de Castilla y León.

La comunidad herpetológica de la zona de estudio cuenta con 14 especies de anfibios y 16 de reptiles (Tabla 1) (Pleguezuelos et al., 2002). Algunas especies son realmente abundantes, como es el caso del eslizón ibérico (*Chalcides striatus*), el lagarto verde (*Lacerta bilineata*) o el verdinegro (*L. schreiberi*), la culebra lisa europea (*Coronella austriaca*) y las víboras mediterráneas (*Vipera aspis* y *V. latastei*), mientras que otras son muy escasas, como ocurre con algunos anfibios urodelos como la salamandra común (*Salamandra salamandra*) en la mitad sur de la zona y anuros como el sapillo pintojo (*Pelodytes punctatus*).

Tabla 1. Listado de las especies de anfibios y reptiles que aparecen distribuidas en el área de estudio. Fuente: Pleguezuelos et al. 2002. * *Pelobates cultripes* aparece distribuido en las inmediaciones del área de estudio; **Actualmente se reconoce *Podarcis hispanica* como un complejo de especies, en la zona de estudio concretamente aparece distribuida el tipo del Noreste (Pinho et al., 2008).

grupo	especies	distribución	categoría UICN
Amphibia			
Urodela			
	<i>Salamandra salamandra</i>	Europa occidental	VU
	<i>Lissotriton helveticus</i>	Europa occidental	LC
	<i>Mesotriton alpestris</i>	Europa occidental	VU
	<i>Triturus marmoratus</i>	Europa occidental	LC
Anura			
	<i>Alytes obstetricans</i>	Europa occidental	NT
	<i>Discoglossus galganoi</i>	endemismo	LC
	<i>D. jeanneae</i>	endemismo	NT
	<i>Pelobates cultripes</i> *	Iberia, Sur Francia	LC
	<i>Pelodytes punctatus</i>	Iberia, Francia	LC
	<i>Hyla arborea</i>	Europa	NT
	<i>Bufo bufo</i>	Europa	LC
	<i>Epidalea calamita</i>	Europa occidental	LC
	<i>Pelophilax perezii</i>	Iberia, Sur Francia	LC
	<i>Rana temporaria</i>	Europa	LC
Reptilia			
Anguidae			
	<i>Anguis fragilis</i>	Europa	LC
Scincidae			
	<i>Chalcides bedriagai</i>	endemismo	NT
	<i>C. striatus</i>	Iberia, Sur Francia	LC
Lacertidae			
	<i>Lacerta bilineata</i>	NE Iberia, Francia, Norte Italia	LC
	<i>L. schreiberi</i>	endemismo	NT
	<i>Timon lepidus</i>	Iberia, Sur Francia	LC
	<i>Zootoca vivipara</i>	Europa	NT
	<i>Podarcis hispanica</i> **	Iberia, Norte de África	LC
	<i>P. muralis</i>	Europa occidental	LC
Colubrinae			
	<i>Coronella austriaca</i>	Europa	LC
	<i>C. girondica</i>	Iberia, Norte de África	LC
	<i>Natrix maura</i>	Iberia, Norte de África	LC
	<i>N. natrix</i>	Europa	LC
Viperinae			
	<i>Vipera aspis</i>	Europa occidental	LC
	<i>V. latastei</i>	Iberia, Norte de África	NT
	<i>V. seoanei</i>	Endemismo	LC

Una tesis doctoral ha de tener unos objetivos bien estructurados y, sobre todo, asequibles. Sin embargo, a medida que se va profundizando en el tema de estudio y obteniendo nueva información, los objetivos pueden ir cambiando o modificándose en mayor o menor medida.

Esto es lo que ha ocurrido durante la realización de esta tesis doctoral. Tras delimitar el área de estudio, el objetivo principal de esta tesis doctoral era, por aquel entonces, el de estudiar y comparar la biología de las tres especies desde varios aspectos, como la selección y uso del hábitat y micro-hábitat, la biología reproductiva, la dieta, la actividad, la demografía y la termorregulación. En pocas palabras era responder a la pregunta: ¿qué hace que esta especie llegue hasta aquí y no pase más allá? Para ello, básicamente tenía que repetir la fórmula de estudio que H. Saint-Girons en 1975, J.-C. Monney en 1996 o J.C. Brito en 2003 habían empleado en su estudio de zonas de contacto entre dos especies de víboras, pero en este caso aplicado a tres especies. Además, dado el escaso conocimiento existente sobre la biología de alguna de las tres especies, como es el caso de las poblaciones ibéricas de *V. aspis* o de la ecología general de *V. seoanei*, cualquier tipo de información obtenida constituía un aliciente, ya que era algo nuevo, inédito.

Estos objetivos generales cambiaron tras los dos primeros meses de trabajo de campo, período en el que capturé los primeros ejemplares sintópicos de *V. aspis* y *V. latastei* y otros con características morfológicas intermedias entre ambas especies. Estos hallazgos nos (hablo en plural, ya que no solamente yo he estado implicado en la realización de este estudio) hicieron sospechar en la existencia de una amplia zona de simpatria e hibridación entre ambas especies. Además, aunque ya se conocía la existencia de convergencia morfológica entre *aspis-seoanei* y *aspis-latastei* en las vertientes Atlántica (Bea, 1985) y sur de los Pirineos (Duguy et al., 1979), respectivamente, el tema nunca se había tratado en profundidad y se desconocía cuál era su causa. Era una ocasión única para tratar aspectos relacionados con la especiación alopátrica, aislamiento reproductor, flujo genético, hibridación, variabilidad y convergencia morfológica, competencia interespecífica y segregación de nicho, así como parte de los otros que ya se querían tratar desde un principio. El enfoque del estudio cambió radicalmente, ya que pasó a centrarse en las dos especies mediterráneas, y con ella los objetivos de mi tesis doctoral.

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral y que se abordan en cada uno de los capítulos que la forman son:

Objetivo 1.- Revisar el conocimiento científico existente sobre la biología general de las tres especies de víboras ibéricas. Este objetivo se aborda en el primer capítulo y, para ello, realizo una

caracterización biológica de las tres especies. Por lo tanto, se tratan temas como la morfología, la variación geográfica, la distribución, los hábitats ocupados, la actividad, la reproducción, la ecología trófica, la demografía, la termorregulación, el dominio vital, el estado de conservación y los factores de amenaza de cada una de las especies de víboras ibéricas. En la elaboración de este capítulo se han revisado muchos de los estudios existentes, aunque, fundamentalmente, me he centrado en aquellos que tratan sobre las poblaciones ibéricas.

Objetivo 2.- Determinar la distribución de las tres especies de víboras ibéricas en el Alto curso del río Ebro. En este capítulo se recoge una publicación titulada “Intermediate forms and syntopy among vipers (*Vipera aspis* and *V. latastei*) in Northern Iberian Peninsula”, publicada en la revista *The Herpetological Bulletin* (Martínez-Freiría et al., 2006, vol. 97, pp. 14-18). Esta publicación es un acercamiento o estudio preliminar de la situación de las tres especies en el Alto Ebro, con los primeros datos sobre distribución y la observación de ejemplares sintópicos y con morfología intermedia entre *V. aspis* y *V. latastei*.

Objetivo 3.- Determinar la distribución potencial de las tres especies de víboras ibéricas en el Alto curso del río Ebro y los factores ambientales que son responsables de éstas. Este objetivo se aborda en el tercer capítulo, en el que se recoge una publicación titulada “GIS-based niche models identify environmental correlates sustaining a contact zone between three species of European vipers”, publicada en la revista *Diversity and Distributions* (Martínez-Freiría et al., 2008, vol. 14, pp. 452-461). Esta publicación es una aplicación de las técnicas de modelación de nicho a los datos de distribución de las tres especies en un entorno de Sistemas de Información Geográfica (SIG). Además de identificar la distribución potencial de las tres especies y los factores ambientales que intervienen en ésta, también se identifican las áreas de potencial simpatría entre los diferentes pares de especies.

Objetivo 4.- Estudiar la variación morfológica de *V. aspis* y *V. latastei* y determinar si los factores ambientales intervienen en la convergencia morfológica de estas dos especies. En este capítulo se recoge una publicación titulada “Geographical patterns of morphological variation and environmental correlates in contact zones: a multi-scale approach using two Mediterranean vipers (Serpentes)” publicada en la revista *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* (Martínez-Freiría et al., 2009, DOI: 10.1111/j.1439-0469.2008.00506.x). En este capítulo se analiza la variación morfológica de ambas especies a dos escalas -una regional, usando toda la zona de

contacto entre *V. aspis* y *V. latastei* del Noreste Ibérico, y otra local, usando la zona de contacto del Alto Ebro- mediante técnicas de geo-estadística en un entrono de SIG. Además, se examinan las correlaciones entre la variación morfológica y variables ambientales para determinar hasta qué punto la convergencia morfológica es debida a una adaptación local a los mismos ambientes.

Objetivo 5.- Estudiar y comparar los rasgos ecológicos de *V. aspis*, *V. latastei* y los híbridos entre ambas especies en la zona de simpatria del Alto Ebro. Este capítulo recoge dos publicaciones tituladas “Ophiophagy and cannibalism in *Vipera latastei* Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae)”, publicada en la revista *The Herpetological Bulletin* (Martínez-Freiría et al., 2006, vol. 96, pp. 26-28), y “Comparative ecological traits of two Mediterranean vipers in a hybrid zone: interspecific competition, niche segregation and competitive advantages”, en proceso de publicación en la revista *Amphibia-Reptilia*. La primera publicación recoge las observaciones de canibalismo y ofidiofagia en *V. latastei*, comportamientos aberrantes e inéditos en esta especie y que nos sitúan en un escenario de elevada competencia. La segunda publicación es el análisis comparativo de la dieta, la selección del micro-hábitat, la actividad, reproducción y demografía de *V. aspis*, *V. latastei* y los híbridos entre ambas especies en la zona de simpatria. Este estudio se realizó a través de diferentes metodologías de campo (como muestreos convencionales, mantenimiento en cautividad o monitorización de ejemplares con radio-transmisores) y se analiza bajo los escenarios de competencia interespecífica y segregación de nicho. Se pretende determinar si alguna de las formas-especies tiene ventajas competitivas respecto a las otras. Además, el estudio de los rasgos reproductivos y demográficos de los híbridos permite inferir su eficacia biológica (*fitness*) y encuadrar la zona híbrida dentro de los modelos existentes para zonas híbridas.

Objetivo 6.- Estudiar y comparar la biología de termorregulación de *V. aspis*, *V. latastei* y los híbridos entre ambas especies en la zona de simpatria del Alto Ebro. Este capítulo recoge una futura publicación titulada “Thermoregulation of Mediterranean vipers in a hybrid zone in Northern Iberian Peninsula” y que está en proceso de edición para ser enviada a publicar. En este estudio se han combinado diferentes metodologías de trabajo de campo (monitorización por radio-telemetría de las temperaturas corporales de varios ejemplares, uso de baterías de termómetros de alta precisión para caracterizar térmicamente los hábitats) y de laboratorio (uso de gradientes térmicos) para determinar las temperaturas seleccionadas y corporales de las víboras y las temperaturas que caracterizan los diferentes medios donde viven.

Objetivo 7.- Estudiar la estructura genética de la zona híbrida entre *V. aspis*, *V. latastei* y *V. seoanei* del Alto Ebro, su coherencia espacial y su relación con los factores climáticos. En este capítulo se recoge una futura publicación titulada “Hybrid approach to hybridization: the application of molecular, geostatistical and GIS tools to the study of a contact zone between three Iberian vipers” y que está en proceso de edición para ser enviado a una revista científica. Para realizar este estudio se han combinado técnicas de secuenciación genética de ADN de microsatélites para varios ejemplares del Alto Ebro y el uso de técnicas de geo-estadística y modelación del nicho ecológico en un entorno de SIG. Además, los resultados obtenidos para la zona híbrida entre *V. aspis* y *V. latastei* son comparados con los estudios realizados sobre variación morfológica, diferencias ecológicas y termorregulativas.

REFERENCIAS

REFERENCES

- Abramsky, Z., Rosenzweig, M.L., Subach, A. (2001). The cost of interspecific competition in two gerbil species. *Journal of Animal Ecology* **70**:4, 561-567.
- Alexandrino, J., Baird, S.J., Lawson, L., Macey, J.R., Moritz, C., Wake, D.B. (2005). Strong selection against hybrids at a hybrid zone in the *Ensatina* ring species complex and its evolutionary implications. *Evolution* **59**: 1334-1347.
- Alexandrino, J., Froufe, E., Arntzen, J.W., Ferrand, N. (2000). Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitaniaca* (Amphibia: Urodela). *Heredity* **88**:66-74.
- Alves P.C., Melo-Ferreira J., Branco M., Suchentrunk F., Ferrand N., Harris D.J. (2008). Evidence for genetic similarity of two allopatric European hares (*Lepus corsicanus* and *L-castroviejoii*) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**: 1191-1197.
- Andersen, B.G., Borns, H.W. (1997). *The Ice Age World. An Introduction to Quaternary History and Research with Emphasis on Northamerica and Europe during the last 2.5 Ma*. Scandinavian Univ. Press, Oslo.
- Arnold, M.L. (1997). *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press. New York.
- Arnold, M.L., Hodges, S.A. (1995a). Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 67-71.
- Arnold, M.L., Hodges, S.A. (1995b). The fitness of hybrids - A response to Day and Schluter. *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 289.
- Ashe, J.S., Marx, H. (1988). Phylogeny of the viperine snakes (Viperinae): Part II. Cladistic analysis and major lineages. *Zoology* **52**: 1-23.
- Ashton, K.G., Feldman, C.R. (2003). Bergmann's rule in nonavian reptiles: turtles follow it, lizards and snakes reverse it. *Evolution* **57**: 1151-1163.
- Atkinson, R.J., Rokas, A., Stone, G.N. (2007). Longitudinal patterns in species richness and genetic diversity in European oaks and oak gallwasps. Pp. 127-151. En: Weiss, S., Ferrand, N. (Eds.). *Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja-Isailović, J., Cogalniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., Poyarkov, N.A., García-París, M., Arntzen, J.W. (2005). Phylogeography of two European newt species - discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology* **14**: 2475-2491.
- Barbadillo, L.J. (1983). Sobre la distribución de anfibios y reptiles en la provincia de Burgos. *Bulletí de la Societat Catalana d'Ictiologia i Herpetologia* **5**: 10-17.
- 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*. GeoPlaneta, Barcelona.
- Barbanera, F., Zuffi, M.A.L., Guerrini, A., Tofanelli, S., Fasola, M., Dini, F. (2009). Molecular phylogeography of the asp viper *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) in Italy: Evidence for introgressive hybridization and mitochondrial DNA capture. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**: 103-114.

- Barton, N.H. (1979). The dynamics of hybrid zones. *Heredity* **43**: 333-339.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113-48.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**: 497-503.
- Baumgarten, A., Williamson, B. (2007). Distribution of the black howler monkey (*Alouatta pigra*) and the mantled howler monkey (*A. palliata*) in their contact zone in eastern Guatemala. *Neotropical Primates* **14**(1): 11-18.
- Bea, A. (1985). La repartición de las víboras *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) y *Vipera seoanei* (Lataste, 1879) en el País Vasco. *Cuadernos de sección, Cienc. Nat., Eusko Ikaskunz* **2**: 7-20.
- Bea, A., Bas, S., Braña, F., Saint-Girons, H. (1984). Morphologie comparée et répartition de *Vipera seoanei* Lataste 1879, en Espagne. *Amphibia-Reptilia* **5**: 395-410.
- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. (1999). *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Bergmann C. (1847). Ueber die Verhältnisse der wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Göttinger Studien, Göttingen* **3**: 595–708. (Diponible en: www.whonamedit.com).
- Blum, M.J. (2008). Ecological and genetic associations across a *Heliconius* hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 330-341.
- Božíková, E., Munclinger, P., Teeter, K.C., Tucker, P.K., Macholan, M., Pialek, J. (2005). Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*: A comparison of two transects. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 363–378.
- Braña, F. (1978). Algunos datos sobre morfología y biología de *Vipera seonei* Lataste 1878 en Asturias. *Supl. Cien. Bol. Idea* **23**: 143-153.
- Braña, F. (1997). Familia Viperidae. Pp. 466-469. En: Salvador, A. (Coord.). *Fauna Ibérica. Vol. 10. Reptiles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid
- Brede, E.G., Thorpe, R. S., Arntzen, J.W., Langton, T.E.S. (2000). A morphometric study of a hybrid newt population (*Triturus cristatus*/*T. carnifex*): Beam Brook Nurseries, Surrey, U.K. *Biological Journal of the Linnean Society* **70**: 685–695.
- Brito, J.C., Crespo, E.G. (2002). Distributional analysis of two vipers (*Vipera latastei* and *V. seoanei*) in a potential area of sympatry in the Northwestern Iberian Peninsula. Pp. 129-138. En: *Biology of the Vipers*. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.). Eagle Mountain Publishing, Utah.
- Brito, J.C., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Fahd, S., Llorente, G.A., Parellada, X. (2006). Morphological variability of the Lataste's viper (*Vipera latastei*) and the Atlas dwarf viper (*Vipera monticola*): patterns of biogeographical distribution and taxonomy. *Amphibia-Reptilia* **27**: 219-240.
- Brito, J.C., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Sillero, N. (2008). Inferring evolutionary scenarios with geostatistics and Geographical Information Systems (GIS) for the viperid snakes *Vipera latastei* and *V. monticola*. *Biological Journal of the Linnean Society* **95**: 790–806.

- Brodin, A., Haas, F. (2006). Speciation by perception. *Animal Behaviour* **72**: 139-146.
- Brodman, R., Jaskula, J. (2002). Activity and microhabitat use during interactions among five species of pond-breeding salamander larvae. *Herpetologica* **58**(3):346-354.
- Bronson, C.L., Grubb, T.C., Braun, M.J. (2003). A test of endogenous and exogenous selection hypothesis for the maintenance of a narrow avian hybrid zone. *Evolution* **57**: 630-637.
- Brown J.H., Lomolino M.V. (1998) *Biogeography*. Sinauer Associates Inc, Massachusetts.
- Burke, J.M., Arnold, M.L. (2001). Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review Genetics* **35**: 31-52.
- Bush, G.L. (2001). Process of speciation. Pp. 371-381. En: Levin, S.A. (Ed.). *Encyclopedia of Biodiversity, Volume 5*. Academic Press.
- Cabrero, J., Camacho, J.P. (2003). Capítulo 6: Fundamentos de genética de poblaciones. Pp. 83-126. En: Soler, M. (Ed.). *Evolución. La base de la biología*. Proyecto Sur de Ediciones, S.L.
- Cadle, J.E. (1987). Geographic distribution: problems in phylogeny and zoogeography. Pp. 77-105. En: *Snakes. Ecology and Evolutionary Biology*. Seigel, R.A., Collins, J.T., Novak, S.S. (Eds.). McGraw Hill, Inc.
- Cadle, J.E. (1992). Phylogenetic relationships among vipers: immunological evidence. Pp. 41-48. En: *Biology of the Pitvipers*. Campbell, J.A., Brodie Jr., E.D. (Eds.). Selva.
- Cameron, T.C., Wearing, H.J., Rohani, P., Sait, S.M. (2007). Two-species asymmetric competition: effects of age structure on intra- and interspecific interactions. *Journal of Animal Ecology* **76**: 83-93.
- Cesaroni, D., Matarazzo, P., Allegrucci, G., Sbordoni, V. (1997). Comparing patterns of geographic variation in cave crickets by combining geostatistic methods and Mantel tests. *Journal of Biogeography* **24**: 419-431.
- Chappel, J., Shackleton, N.J. (1986). Oxygen isotopes and sea levels. *Nature* **324**: 137-139.
- Choler, P., Erschbamer, B., Tribsch, A., Gielly, L., Taberlet, P. (2004). Genetic introgression as a potential to widen a species' niche: Insights from alpine *Carex curvula*. *PNAS* **101**: 171-176.
- Clarke, R.D. (1992). Effects of microhabitat and metabolic rate on food intake, growth and fecundity of two competing coral reef fishes. *Coral Reefs* **11**: 199-205.
- Clutton-Brock, T.H. (Ed.) (1990). *Reproductive Success: Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems*. University Of Chicago Press, Chicago.
- Connell, J.H. (1980). Diversity and coevolution of competitors, or the ghost of competition past. *Oikos* **35**: 131-138.
- Connell, J.H. (1983). On the prevalence and relative importance of interspecific competition: evidence from field experiments. *The American Naturalist* **122**: 661-696.
- Costedoat, C., Pech, N., Salducci, M.-D., Chappaz, R., Gilles, A. (2005). Evolution of mosaic hybrid zone between invasive and endemic species of Cyprinidae through space and time. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 135-155.
- Cracraft, J. (2000). Species concepts in theoretical and applied biology: a systematic debate with consequences. Pp. 3-14. En: *Species Concepts: A Debate*. Wheeler, Q., Meier, R. (Eds.) Columbia University Press, New York.

- Crespo, E.G. (2001). Paleo-Herpetofauna de Portugal. *Museu Bocage, Publicações Avulsas* **2**: 1-186.
- Cruzan, M.B., Arnold, M.L. (1993). Ecological and genetic associations in an Iris hybrid zone. *Evolution* **47**: 1432-1445.
- Dasmahapatra, K.K., Blum, M.J., Aiello, A., Hackwell, S., Davies, N., Bermingham, E.P., Mallet, J. (2002). Inferences from a rapidly moving hybrid zone. *Evolution* **56**: 741-753.
- Davison, A., McMillan, W.O., Griffin, A.S., Jiggins, C.D., Mallet, J.L.B. (1999). Behavioral and Physiological Differences between Two Parapatric *Heliconius* Species. *Biotropica* **31**: 661-668.
- Dayan, T., Simberloff, D., Tchernov, E., Yom-Tov, Y. (1992). Canine carnassials: character displacement in the wolves, jackals and foxes of Israel. *Biological Journal of the Linnean Society* **45**: 315-331.
- DeSalle, R., Hunt, J.A. (1987). Molecular evolution in Hawaiian drosophilids. *Trends in Ecology and Evolution* **2**: 213-216.
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Dobzhansky, T. (1940). Speciation as a stage in evolutionary divergence. *The American Naturalist* **74**: 312-321.
- Dorken, M.E., Pannell, J.R. (2007). The maintenance of hybrid zones across a disturbance gradient. *Heredity* **99**: 89-101.
- Duguy, R., Saint Girons, H. (1978). La répartition des vipères et de quelques Autres Reptiles. *Annales Société Sciences Naturelles* **6**: 351-353.
- Duguy, R., Martínez-Rica, J. P., Saint-Girons, H. (1979). La répartition des vipères dans les Pyrénées et les régions voisines du nord de l'Espagne. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* **115**: 359-377.
- Eckenwalder, J.E. (1984). Natural intersectional hybridization between North American species of *Populus* (Salicaceae) in sections *Aigeiros* and *Tacamahaca*. III. Paleobotany and Evolution. *Canadian Journal of Botany* **62**: 336-342.
- Fitzpatrick, B.M., Shaffer, B. (2004). Environment-dependent admixture dynamics in a Tiger Salamander hybrid zone. *Evolution* **58**: 1282-1293.
- Font Tullot, Y. (1983). *Climatología de España y Portugal*. Instituto Nacional de Meteorología. Madrid.
- García, J.T., Arroyo, B.E. (2005). Food-niche differentiation in sympatric Hen *Circus cyaneus* and Montagu's Harriers *Circus pygargus*. *Ibis* **147**: 144-154.
- García-París, M., Montori, A., Herrero, P. (2004). Amphibia, Lissamphibia. En: Ramos, M.A. et al. (Eds). *Fauna Ibérica, vol. 24*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid.
- Garrigues, T., Dauga, C., Ferquel, E., Choumet, V., Failloux, A.-B. (2005). Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**: 35-47.

- Gasc, J.-P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez-Rica, J.P., Maurin, H., Oliveira, M.E., Sofianidou, T.S., Veith, M. and Zuiderwijk, A. (1997). *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*. Societas Europaea Herpetologica and Museum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Gaubert, P., Taylor, P.J., Fernandes, C. A., Bruford, M.W., Veron, G. (2005). Patterns of cryptic hybridization revealed using an integrative approach: a case study on genets (Carnivora, Viverridae, *Genetta spp.*) from the southern African subregion. *Biological Journal of the Linnean Society* **86**: 11–33.
- Gause, G.F. (1935). *The struggle for existence*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Gee J.M. (2004). Gene flow across a climatic barrier between hybridizing avian species, California and Gambel's quail (*Callipepla californica* and *C. gambelii*). *Evolution* **58**: 1108-1121.
- Genner, M.J., Turner, G.F. & Hawkins S.J. (1999). Foraging of rocky habitat cichlid fishes in Lake Malawi, evidence of niche partitioning? *Oecologia* **121**: 283-292.
- Gibbs, H.L., Corey, S.J., Blouin-Demers, G., Prior, K.A., Weatherhead, P.J. (2006). Hybridization between mtDNA-defined phylogeographic lineages of black ratsnakes (*Pantherophis sp.*). *Molecular Ecology* **15**: 3755–3767.
- Godinho, R., Crespo, E.G., Ferrand, N., Harris, D.J. (2005). Phylogeny and evolution of the green lizards, *Lacerta spp.* (Squamata: Lacertidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Amphibia-Reptilia* **26**: 271-285.
- Gómez-Zurita, J., Petitpierre, E., Juan, C. (2000). Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Molecular Ecology* **9**: 557-570.
- Gonçalves H., Martínez-Solano I., Ferrand N., García-París M. (2007). Conflicting phylogenetic signal of nuclear vs mitochondrial DNA markers in midwife toads (Anura, Discoglossidae, *Alytes*): deep coalescence or ancestral hybridization? *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 494-500.
- Goodman, S. J., Barton, N. H., Swanson, G., Abernethy, K., Pemberton, J. M. (1999). Introgression through rare hybridization: A genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. *Genetics* **152**: 355–371.
- Graves, B.M., Duvall, D. (1990). Spring emergence patterns of prairie rattlesnakes and wandering garter snakes in Wyoming. *Journal of Herpetology* **24**: 351-356.
- Gray, D. A., Cade, W.H. (2000). Sexual selection and speciation in field crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 14449-14454.
- Greene, H.W. (1992). The ecological and behavioral context for pitviper evolution. Pp. 107-117. En: *Biology of the Pitvipers*. Campbell, J.A., Brodie Jr., E.D. (Eds.). Selva.
- Greene, H.W. (2003). *Snakes: The Evolution of Mystery in Nature*. University of California Press, Berkeley.
- Gröning, J., Hochkirch, A. (2008). Reproductive inference between animal species. *The Quarterly Review of Biology* **83**: 257-282.
- Guisan, A., Hofer, U. (2003). Predicting reptile distributions at the mesoscale: relation to climate and topography. *Journal of Biogeography* **30**: 1233-1243
- Halliday, T., Adler, K. (2007). *La Gran Enciclopedia de los Anfíbios y Reptiles*. Editorial Libsa. Madrid.

- Harrison, R.G. (1986). Pattern and process in a narrow hybrid zone. *Heredity* **56**: 337-349.
- Harrison, R.G. (1990). Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* **7**: 69-128.
- Harrison, R.G. (1993). Hybrids and hybrid zones: historical perspective. Pp. 3-12. En: Harrison, R.G. (Ed.). *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press. Oxford.
- Hart, P. (2003). Habitat use and feeding behaviour in two closely related fish species, the three-spined and nine-spined stickleback: an experimental analysis. *Journal of Animal Ecology* **72**: 777-783.
- Herrmann, H.-W., Joger, U. (1995). Molecular data on the phylogeny of African vipers – preliminary results. Pp. 92-97. En: *Scientia Herpetologica*. Llorente, G., Montori, A., Santos, X., Carretero, M.A. (Eds.). Asociación Herpetológica Española e Societas Europaea Herpetologica.
- Herrmann, H.-W., Joger, U. (1997). Evolution of viperinae snakes. *Symposium Zoological Society London* **70**: 43-61.
- Herrmann, H.-W., Joger, U., Lenk, P., Wink, M. (1999). Morphological and Molecular Phylogenies of Viperines: Conflicting Evidence? *Kaupia* **8**: 21-30.
- Hewitt, G.M. (1988). Hybrid zones – natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution* **3**: 158-167.
- Hewitt, G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.
- Hewitt, G.M. (1999). Post-glacial recolonisation of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-913.
- Hewitt, G.M. (2003). *Ice Ages: their impact on species distributions and evolution*. Evolution of Planet Earth, Academic Press.
- Hey, J. (2001). The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 326-329.
- Hey, J. (2006). On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology and Evolution* **21**: 447-50.
- Higgie, M., Blows, M.W. (2007). Are traits that experience reinforcement also under sexual selection? *American Naturalist* **170**: 409-420.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965-1978. <http://www.worldclim.org/>
- Hollocher, H. (2000). Theories of speciation. Vol. 5. Pp. 383-396. En: *The Encyclopedia of Biodiversity*. Edited by S. A. Levin. Academic Press, NY.
- Holm, E., Edney, E.B. (1973). Daily activity of Namib Desert arthropods in relation to climate. *Ecology* **54**: 45-56.
- Hoskin, C., Higgie, M., McDonald, K.R., Moritz, C. (2005). Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature* **437**: 1353-1356.

- Howard, D.J. (1982). *Speciation and coexistence in a group of closely related ground crickets*. PhD Dissertation. Yale University, New Haven.
- Howard, D.J. (1986). A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution* **40**: 34-43.
- Hutchinson, G.E. (1957). *A treatise on limnology. Vol. 1. Geography, physics, and chemistry*. John Wiley & Sons.
- Imes, D.L., Geary, L.A., Grahn, R.A., Lyons, L.A. (2006). Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (TYR) mutation. *Animal Genetics* **37**: 175-178.
- INE (2008). Instituto Nacional de Estadística. Cifras de población referidas al 01/01/2008 Real Decreto 2124/2008, de 26 de diciembre. En: <http://www.ine.es>
- Ineich, I. (1995). État actuel de nos connaissances sur la classification des serpents venimeux. *Bulletin de la Société Herpetologique de France* **75-76**: 7-24.
- JCYL (2001). *Bases para la ordenación, el uso y la gestión del espacio natural de HOCES DEL EBRO Y RUDRON (BURGOS)*. Junta de Castilla y León. Consejería de Medio ambiente. Dirección general de Medio natural.
- JCYL (2006). *Plan de Ordenación de los Recursos Naturales de "Hoces del Alto Ebro y Rudrón" (Burgos). Documento resumen*. Junta de Castilla y León. Consejería de Medio ambiente. Dirección general de Medio natural.
- JCYL (2008). Página principal de la Junta de Castilla y León. Medio ambiente. Medio natural. Espacios naturales. En: <http://www.jcyl.es>
- Jiggins, C.D., Mallet, J. (2000). Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 250-255.
- Jiggins, C.D., McMillan, W.O., Neukirchen, W., Mallet, J. (1996). What can hybrid zones tell us about speciation? The case of *Heliconius erato* and *H. himera* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **59**: 221-242.
- Katoh, M., Ribi, G. (1996). Genetic evidence for natural hybridization and apparent introgression between freshwater snail species (*Viviparus ater* and *V. contectus*). *Journal of Evolutionary Biology* **9**: 67-82.
- Kenis, M., Auger-Rozenberg, M.-A., Roques, A., Timms, L., Péré, C., Cock, M.J.W., Settele, J., Augustin, S., Lopez-Vaamonde, C. (2009). Ecological effects of invasive alien insects. *Biological Invasions* **11**: 21-45.
- King, R.B. (1997). Variation in Brown Snake (*Storeria dekayi*) morphology and scalation: sex, family, and microgeographic differences. *Journal of Herpetology* **31**: 335-346.
- Kreiner, G. (2007). *The Snakes of Europe. All species from West of the Caucasus Mountains*. Frankfurt am Main. Edition Chimaira. Germany.
- Langkilde, T., Shine, R. (2004): Competing for crevices: interspecific conflict influences retreat-site selection in montane lizards. *Oecologia* **140**: 684-691.
- Lapini, L. (1983). *Anfibi e rettili (del Friuli Venezia Giulia)*. Carlo Lorenzini Editore. Udine, Italy.

- Lario, J. (1996). *Último y presente interglacial en el área de conexión Atlántico-Mediterráneo (Sur de España). Variaciones del nivel del mar, paleoclima y paleoambientes*. Tesis Doctoral. Univ. Complutense, Madrid.
- Leaché, A.D., Cole, C.J. (2007). Hybridization between multiple fence lizard lineages in an ecotone: Locally discordant variation in mitochondrial DNA, chromosomes, and morphology. *Molecular Ecology* **16**: 1035-1054.
- Lee, M.S.Y., Scanlon, J.D. (2002). Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. *Biological Review* **77**: 333-401.
- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., Joger, U. (2001). Evolutionary Relationships among the True Vipers Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**: 94-104.
- Lotsy, J.P. (1931). On the species of the taxonomist in its relation to evolution. *Genetica* **13**: 1-16.
- Loureiro, A., Ferrand de Almeida, N., Carretero, M.A., Paulo, O.S. (Eds.) (2008). *Atlas dos Anfíbios e Répteis de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza e Biodiversidade, Lisboa.
- Loveridge, A.J., Macdonald, D.W. (2003). Niche separation in sympatric jackals (*Canis mesomelas* and *C. adustus*). *Journal of Zoology* **259**: 143-153.
- Luiselli, L. (2006). Resource partitioning and interspecific competition in snakes: the search for general geographical and guild patterns. *Oikos* **114**: 193-211.
- Luiselli, L., Filippi, E., Di Lena, E. (2007). Ecological relationships between sympatric *Vipera aspis* and *V. ursinii* in High-Altitude habitats of Central Italy. *Journal of Herpetology* **41**: 378-384.
- Mabry, M., Verrell, P.A. (2004). Stifled sex in sympatry: patterns of sexual incompatibility among desmognathine salamanders. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 367-375.
- Machordom, A., Doadrio, I. (2001). Evidence of a cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**: 252-263.
- Malhotra, A., Thorpe, R.S. (1997). Microgeographic variation in scalation of *Anolis oculatus* (Dominica, West Indies): a multivariate analysis. *Herpetologica* **53**: 49-62.
- Mallow, D., Ludwig, D. & Nilson, G. (2003). *True Vipers. Natural History and Toxinology of Old World Vipers*. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida.
- Marx, H., Ashe, J. S., Watrous, L. E. (1988). Phylogeny of the Viperine Snakes (Viperinae): Part I. Character Analysis. *Fieldiana Zoology* **51**: 1-16.
- Masta, S. E., Maddison, W.P. (2002). Sexual selection driving diversification in jumping spiders. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 4442-4447.
- Mayr, E. (1963). *Animal species and evolution*. Belknap Press, Cambridge.
- McDonald, D. (2006). *La Gran Enciclopedia de los Mamíferos*. Editorial Libsa. Madrid.
- McDonald, D.B., Clay, R.P., Brumfield, R.T., Braun, M.J. (2001). Sexual selection on plumage and behavior in an avian hybrid zone: experimental tests of male-male interactions. *Evolution* **55**: 1443-1451.
- Mebert, K. (2008). Good species despite massive hybridization: genetic research on the contact zone between the watersnakes *Nerodia sipedon* and *N. fasciata* in the Carolinas, USA. *Molecular Ecology* **17**: 1918-1929.

- Monney, J.-C. (1996). *Biologie comparée de Vipera aspis L. et de Vipera berus L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes Bernoises*. PhD Thesis. Institute of Zoology, Faculty of Sciences, University of Neuchatel, Neuchatel, Switzerland.
- Mooney, H.A., Cleland, E.E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *PNAS* **98**: 5446-5451.
- Moore, W.S. (1977). An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review of Biology* **52**: 263-277.
- Mulcahy, D.G., Spaulding, A.W., Meldenson, J.R., Brodie, E.D.JR. (2006). Phylogeography of the flat-tailed horned lizard (*Phrynosoma mcallii*) and systematics of the *P. mcallii-platyrrhinus* mtDNA complex. *Molecular Ecology* **15**: 1807-1826.
- Nilson, G., Andrén, C. (1997). Evolution, systematics and biogeography of Palaearctic vipers. Pp. 31-42. En: *Venomous snakes. Ecology, evolution and snakebite*. Thorpe, R.S., Wüster, W., Malhotra, A. (Eds.). The Zoological Society of London, Oxford.
- Nilson, G., Andrén, C. (2001). The Meadow and Steppe Vipers of Europe and Asia. The *Vipera (Acridophaga) ursinii* complex. *Acta Zoologica. Academiae Scientiarum Hungaricae* **47**: 87-267.
- Obermayer, G. (1967). *Vipera aspis zinnikeri* x *Vipera ammodytes ammodytes*. *DATZ* **20**: 255-256.
- Olden, J.D., Poff, N.L., Douglas, M.R., Douglas, M.E., Fausch, K.D. (2004). Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 18-24.
- Pagano, A., Dubois, A., Lesbarrères, D., Lodé, T. (2003). Frog alien species: a way for genetic invasion? *C. R. Biologies* **326**: 85-92.
- Panhuis, T.M., Butlin, R., Zuk, M., Tregenza, T. (2001). Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 364-371.
- Parsons, T.J., Olson, S.L., Braun, M.J. (1993). Unidirectional spread of secondary sexual plumage traits across an avian hybrid zone. *Science* **260**: 1643-1646.
- Patten, M.A., Rotenberry, J.T., Zuk, M. (2004). Habitat selection, acoustic adaptation, and the evolution of reproductive isolation. *Evolution* **58**: 2144-2155.
- Perfectti, F. (2003). Especiación: modos y mecanismos. Pp. 307-321. En: Soler, M. (Ed.). *Evolución. La base de la biología*. Proyecto Sur de Ediciones, S.L.
- Perrins, C. (2005). *La Gran Enciclopedia de las Aves*. Editorial Libsa. Madrid.
- Phillips, B.L., Baird, S.J.E., Moritz, C. (2004). When vicars meet: a narrow contact zone between morphologically cryptic phylogeographic lineages of the rain forest skink, *Carlia rubrigularis*. *Evolution* **58**: 1536-1548.
- Pianka, E.R. (1973). The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* **4**: 53-74.
- Pianka, E.R., Huey, R.B., Lawlor, L.R. (1979). Niche segregation in desert lizards. Chapter 4. Pp. 67-115. En: Horn, D.J., Mitchell, R., Stairs, G.R. (Eds.). *Analysis of Ecological Systems*. Ohio State University Press, Columbus.

- Pinho, C., Harris, D.J., Ferrand, N. (2007). Comparing patterns of nuclear and mitochondrial divergence in a cryptic species complex: the case of Iberian and North African wall lizards (*Podarcis*, Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 121-133.
- Pinho, C., Harris, D.J., 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**: 63.
- 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.
- Pleguezuelos, J.M., Fahd, S., 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.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B. (2005). *Vertebrate Life*. 7th ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Pusch, K., Seifert, B., Foitzik, S., Heinze, J. (2006). Distribution and genetic divergence of two parapatric sibling ant species in Central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **88**: 223–234.
- Rage, J.-C. (1987). Fossil Record. Pp. 51-76. En: Seigel, R.A., Collins, J.T., and Novak, S.S. (Eds.). *Snakes: Ecology and evolutionary biology*. McGraw-Hill Publishing.
- Rage, J.-C. (1994a). Origen y evolución de las serpientes. Pp. 26-32. En: *Serpientes*. Susaeta Ediciones, S.A. Tikal Ediciones.
- Rage, J.-C. (1994b). La diversidad de las serpientes. Pp. 34-47. En: *Serpientes*. Susaeta Ediciones, S.A. Tikal Ediciones.
- Rage, J.-C. (1994c). El aparato venenoso. Pp. 22-23. En: *Serpientes*. Susaeta Ediciones, S.A. Tikal Ediciones.
- Ray, D.A., Dever, J.A., Platt, S.G., Rainwater, T.R., Finger, A.G., McMurtry, S.T., Batzer, M.A., Barr, B., Stafford, P.J., McKnight, J., Densmore, L.D. (2004). Low levels of nucleotide diversity in *Crocodylus moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*. *Conservation Genetics* **5**: 449-462.
- Reinert, H.K. (1984a). Habitat separation between sympatric snake populations. *Ecology* **65**: 478–486.
- Reinert, H.K. (1984b). Habitat variation within sympatric snake populations. *Ecology* **65**: 1673–1682.
- Reudink, M.W. (2007). Structure and dynamics of the hybrid zone between Black-capped chickadee (*Poecila atricapillus*) and Carolina chickadee (*P. carolinensis*) in Southeastern Pennsylvania. *The Auk* **124**: 463-478.
- Ricklefs, R.E. (1998): *The Economy of Nature*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Rieseberg, L.H., Baird, S.J.E., Gardner, K.A. (2000). Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Molecular Biology* **42**: 205-224.
- Riley, S.P.D., Shaffer, H.B., Voss, S.R., Fitzpatrick, B.M. (2003). Hybridization between a rare, native Tiger salamander (*Ambystoma californiense*) and its introduced congener. *Ecological Applications* **13**: 1263-1275.

- Rivas-Martínez, S. (1987). *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA.
- Rivas-Martínez, S., Loidi Arregui, J. (1999). *Biogeografía de la Península Ibérica*. Itinera geobotanica. Asociación Española de Fitosociología (AEFA).
- Rohwer, S., Bermingham, E., Wood, C. (2001). Plumage and mitochondrial DNA haplotype variation across a moving hybrid zone. *Evolution* **55**: 405-422.
- Rubidge, E.M., Taylor, E.B. (2004). Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). *Molecular Ecology* **13**: 3735-3749.
- Saint-Girons, H. (1975). Coexistence de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un probleme de competition interspecific. *Terre et Vie* **29**: 590-613.
- Saint-Girons, H. (1977). Caryotypes et évolution des Vipères européennes. *Bulletin Société Zoologique de France, Paris* **102**: 39-52.
- Saint-Girons, H. (1978). Morphologie externe comparée et systématique des vipères d'Europe (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **85**: 565-595.
- Saint-Girons, H. (1980). Biogéographie et évolution des vipères européennes. *C.R. Société Biogéographique* **496**: 146-172.
- Saint-Girons, H. (1990a). Morphologie comparée des hybrides de *Vipera seoanei* Lataste, 1879 x *Vipera aspis* (L.). *Amphibia-Reptilia* **11**: 197-200.
- Saint-Girons, H. (1990b). Croissance, maturité sexuelle et variations ontogéniques des periods d'alimentation et des mues chez deux vipers hybrids (*Vipera aspis* x *Vipera seoanei*) dans des conditions semi-naturelles. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **54**: 62-68.
- Saint Girons, H., Detrait, J. (1978). Communautés antigéniques des venins et systématique des Vipères européennes. Etude immunoelectrophorétique. *Bulletin Société Zoologique de France* **103**: 155-166.
- Saint-Girons, H., Duguy, R. (1976). Écologie et position systématique de *Vipera seoanei* Lataste, 1879. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **101**: 325-339.
- Saldamando, C.I., Tatsuta, H., Butlin, R.K. (2005). Hybrids between *Chorthippus brunneus* and *C. jacobsi* (Orthoptera: Acrididae) do not show endogenous postzygotic isolation. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 195-203.
- Salomon, M. (2001). Evolutionary biogeography and speciation: essay on a synthesis. *Journal of Biogeography* **28**: 13-27.
- Salvador, L., Alia, R., Agundez, R., Gil, L. (2000). Genetic variation and migration pathways of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in the Iberian peninsula. *Theoretical Applied Genetics* **100**: 89-95.
- Sanders, K.L., Malhotra, A., Thorpe, R.S. (2004). Ecological diversification in a group of Indomalayan pit-vipers (*Trimeresurus*): convergence in taxonomically important traits has implication for species identification. *Journal of Evolutionary Biology* **17**: 721-731.
- Schliewen, U.K., Tautz, D., Pääbo, S. (1994). Sympatric speciation suggested by monophyly of crater lake cichlids. *Nature* **368**: 629-632.

- Schluter, D. (2000). *The ecology of adaptive radiation*. Oxford University Press.
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 372-380.
- Schoener, T.W. (1974). Resource partitioning in ecological communities. *Science* **185**: 27-39.
- Schoener, T.W. (1983). Field experiments on interspecific competition. *American Naturalist* **122**: 240-285.
- Schoener, T.W. (1985). Some comments on Connell's experiments on interspecific competition. *American Naturalist* **125**: 730-740.
- Schuett, G.W., Hardy Sr., D.L., Greene, H.W., Earley, R. L., Grober, M. S., Van Kirk, E. A., Murdoch, W. J. (2005). Sympatric rattlesnakes with contrasting mating systems show differences in seasonal patterns of plasma sex steroids. *Animal Behaviour* **70**: 257-266.
- Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N.J., Hewitt, G.m. (2001). DNA footprints of European hedgehogs, *Eri-naceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* **10**: 2187-2198.
- Semlitsch, R.D. (1993a). Asymmetric competition in mixed populations of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolution* **47**: 510-519
- Semlitsch, R.D. (1993b). Adaptive genetic variation in growth and development of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolution* **47**: 1895-1818.
- Semlitsch, R.D., Reyer, H.-U. (1992). Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: interaction with pond drying and interspecific competition. *Evolution* **46**: 665-676.
- Servedio, M.R., Noor, M.A.F. (2003). The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**: 339-364.
- Siemers, B.M., Swift, S.M. (2006). Differences in sensory ecology contribute to resource partitioning in the bats *Myotis bechsteinii* and *Myotis nattereri* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59**: 373-380.
- SIGA (2005). Servicio de Información Geográfico Agrario, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Spain. <http://www.mapya.es/es/sig/pags/siga/intro.htm>
- Sih, A., Crowley, P., McPeck, M., Petranka, J., Stohmeier, K. (1995). Predation, competition, and prey communities: a review of field experiments. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 269-311.
- Sites, J.W. Jr., Barton, N.H., Reed, K.M. (1995). The genetic structure of a hybrid zone between two chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae) in central Mexico. *Evolution* **49**: 9-36.
- Slowinski, J.B., Lawson, R. (2002). Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **24**: 194-202.
- Soler, J.J. (2003). Selección natural y adaptación. Pp. 127-157. En: Soler, M. (Ed.). *Evolución. La base de la biología*. Proyecto Sur de Ediciones, S.L.
- Stearns, S.C., Hoekstra, R.F. (2000). *Evolution. An introduction*. Oxford University Press, New York.
- Stein, A.C., Uy, J.A.C. (2006). Unidirectional introgression of a sexually selected trait across an avian hybrid zone: A role for female choice? *Evolution* **60**: 1476-1485.

- Sullivan, B.K. (1995). Temporal stability in hybridization between *Bufo microscaphus* and *B. woodhousii* (Anura: Bufonidae): Behavior and morphology. *Journal Evolutionary Biology* **8**: 233-247.
- Szymura, J.M. (1993). Analysis of hybrid zones with *Bombina*. Pp. 261-289. En: Harrison, R.G. (Ed.). *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press. Oxford.
- Szymura, J.M., Barton, N.H. (1986). Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution* **40**: 1141-1159.
- Szymura, J.M., Barton, N.H. (1991). The genetic structure of the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata*: comparisons between transects and between loci. *Evolution* **45**: 237-261.
- Szyndlar, Z. (1984). Fossil snakes from Poland. *Acta Zoologica Cracoviensia* **28**: 1-156.
- Szyndlar, Z., Rage, J.-C. (1999). Oldest fossil vipers (Serpentes: Viperidae) from the Old World. *Kaupia. Darmstädter Beiträge zur Naturgeschichte* **8**: 9-20.
- Szyndlar, Z., Rage, J.-C. (2002). Fossil record of the true vipers. Pp. 419-444. En: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.). *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Utah.
- T.T.R.D. (2008). *The Tigr Reptile database*. Family Viperidae. <http://www.tigr.org/reptiles/families/Viperidae.html>
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F. (1998). Comparative phylogeography and post-glacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.
- Takami, Y., Suzuki, H. (2005). Morphological, genetic and behavioural analyses of a hybrid zone between the ground beetles *Carabus lewisianus* and *C. albrechti* (Coleoptera, Carabidae): asymmetrical introgression caused by movement of the zone? *Biological Journal of the Linnean Society* **86**: 79-94.
- Taper, M.L., Case, T.J. (1992). Coevolution among competitors. Pp. 63-110. En: Futuyma, D.J., Antonovics, J. (Eds.). *Oxford surveys in evolutionary biology*. Vol. 8. Oxford University Press, Oxford.
- Thorpe, R.S. (1987). Geographic variation: a synthesis of cause, data, pattern and congruence in relation to subspecies, multivariate analysis and phylogenesis. *Italian Journal of Zoology* **54**: 3-11.
- Ursenbacher, S., Carlsson, M., Helfer, V., Tegelström, H., Fumagalli, L. (2006b). Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* **15**: 3425-3437.
- Ursenbacher, S., Conelli, A., Golay, P., Monney, J.-C., Zuffi, M.A.L., Thiery, G., Durand, T., Fugamalli, L. (2006a). Phylogeography of the asp viper (*Vipera aspis*) inferred from mitochondrial DNA sequence data: Evidence for multiple Mediterranean refugial areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 546-552.
- Ursenbacher, S., Schweiger, S., Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., Fumagalli, L., Mayer, W. (2008). Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): Evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**: 1116-1128.

- Veen, T., Borge, T., Griffith, S.C., Sætre, G.P., Bures, S., Gustafsson, L., Sheldon, B.C. (2001). Hybridization and adaptive mate choice in flycatchers. *Nature* **411**: 45-50.
- Vörös, J., Alcobendas, M., Martínez-Solano, I., García-París, M. (2006). Evolution of *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Anura: Discoglossidae) in the Carpathian Basin: A history of repeated mt-DNA introgression across species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 705-718.
- Webb, T. III, Bartlein, P.J. (1992). Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annual Review of Ecology and Systematics* **23**: 141-173.
- Weiss, S., Ferrand, N. (Eds.) (2007). *Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- West-Eberhard, M.J. (2003). Chapter 3. Plasticity. In: West-Eberhard, M.J. (Ed.). *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York.
- Wheeler, Q., Meier, R. (2000). *Species Concepts: A Debate*. Columbia University Press, New York.
- Wiens, J.J., Graham, C.H. (2005). Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **36**: 519–539.
- Wilson, E.O. (1965). The challenge for related species. Pp. 7-24. En: Baker, H.G., Stebbins, G.L. (Eds.). *The genetics of colonizing species*. Academic Press, Orlando, FL.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K. (2001). Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *Science* **292**: 686-693
- Zazo, C. (1999). Interglacial sea levels. *Quaternary International* **55**: 101-113.
- Ziv, Y., Abramsky, Z., Kotler, B.P., Subach, A. (1993). Interference competition and temporal and habitat partitioning in two gerbil species. *Oikos* **66**: 237–246.
- Zuffi, M.A.L. (2002). A critique of the systematic position of the asp viper subspecies *Vipera aspis aspis* (Linnaeus, 1758), *Vipera aspis atra* Meisner, 1820, *Vipera aspis francisciredi* Laurenti, 1768, *Vipera aspis hugyi* Schinz, 1833 and *Vipera aspis zinnikeri* Kramer, 1958. *Amphibia-Reptilia* **23**: 191-213.
- Zuffi, M.A.L., Bonnet, X. (1999). Italian subspecies of the aspic viper, *Vipera aspis*: patterns of variability and distribution. *Italian Journal of Zoology* **66**: 87-95.
- Zuffi, M.A.L., Gentili, A., Razzetti, E., Scali, S. (2001). Transition-hybridisation areas in parapatric *Vipera aspis* subspecies from northern Italy. *Biota* **2**: 52.
- Zug G.R., Vitt, L.J., Caldwell, J.P. (2001). *Herpetology. 2nd ed.* Academic Press. San Diego.

CHAPTER 1

Caracterización biológica de las víboras ibéricas

Biological characterization of Iberian vipers

En la península Ibérica existen tres especies de víboras: una especie de carácter eurosiberiano, perteneciente al clado *pelias*, la víbora de Seoane *Vipera seoanei*, y dos especies mediterráneas, pertenecientes al clado *aspis*, la víbora áspid *Vipera aspis* y la víbora hocicuda *Vipera latastei* (Lenk et al., 2001; Pleguezuelos et al., 2002; Mallow et al., 2003; Garrigues et al., 2005).

Las tres especies se diferencian no sólo en cuanto a sus relaciones filogenéticas e historia evolutiva, distribuciones y preferencias climáticas, sino que también por los siguientes rasgos morfológicos (Fig. 1) (Braña, 1997a):

- i) *V. seoanei* presenta un hocico redondeado, no dirigido hacia arriba, con dos escamas apicales (raramente una y excepcionalmente tres);
- ii) *V. aspis* presenta un hocico anguloso, dirigido hacia arriba pero sin formar un apéndice, con dos o tres escamas apicales;
- iii) *V. latastei* presenta un hocico anguloso, dirigido hacia arriba formando un apéndice, con tres a siete escamas apicales.

Figura 1. Vista lateral y dorsal de la cabeza de una hembra de *Vipera seoanei* con dos escamas apicales (A y D), una hembra de *V. aspis* con dos escamas apicales (B y E) y una hembra de *V. latastei* con cinco escamas apicales (C y F). Los círculos rojos están situados en torno a las escamas apicales.

Sin embargo, las tres especies presentan rasgos ecológicos muy semejantes en lo referente a (Bea, 1997; Bea & Braña, 1997; Nilson & Andrén, 1997; Braña, 1997a,b):

- i) la alimentación, ya que cazan normalmente de día y al acecho (“sit and wait” o “ambush predators”), envenenan sus presas mediante mordedura y las rastrean usando la lengua y el órgano vomeronasal; además, básicamente depredan sobre las mismas presas, los micro-mamíferos;
- ii) la actividad, ya que normalmente pasan el invierno inactivas en refugios de hibernación, empezando su actividad a finales de invierno o principios de primavera y extendiéndola hasta principios de otoño; su ritmo circadiano de actividad es unimodal en primavera y otoño y bimodal en verano (presentando actividad nocturna en los meses más calurosos);
- iii) la reproducción, ya que presentan la misma estrategia reproductora en los machos (espermatogénesis de tipo mixto), lo que posibilita dos períodos de acoplamiento, uno en primavera y otro a finales de verano (*V. seoanei* parece utilizar sólo el primer período); además, las tres especies son ovovivíparas, ocurriendo los partos principalmente a finales de verano y “capital breeders”, es decir, las hembras necesitan llegar hasta un umbral en la cantidad de reservas grasas para poder reproducirse, lo que normalmente se traduce en un ciclo reproductor de tipo bi- o tri-anual.

A continuación, se detallan las características biológicas más relevantes para las tres especies.

Víbora áspid - *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758)

Figura 2. Varios ejemplares de *Vipera aspis zinnikeri* del Noroeste de la provincia de Burgos: tres machos adultos (A, F y G), dos hembras adultas (B y E), detalle lateral de la cabeza de una hembra adulta (C) y detalle dorsal de la cabeza de un macho adulto (D).

Identificación

Se trata de un vipérido de mediano tamaño y aspecto robusto, con la cola proporcionalmente corta. Cabeza bien diferenciada del resto del cuerpo, moderadamente ensanchada en su parte posterior, lo que le da un aspecto triangular, y pupila vertical. Tiene el extremo del hocico ligeramente prominente y levantado, pero sin formar un apéndice (Fig. 1 y 2) (Braña, 1997b; Barbadillo et al., 1999; Mallow et al., 2003; Trutnau et al., 2005; Kreiner, 2007).

Presenta variaciones de tamaño notables entre las diferentes poblaciones, tanto en lo que se refiere a sus dimensiones extremas como al tamaño medio de la población (Duguy & Saint-Girons, 1970). La longitud total media varía entre los 600-700 mm (500–630 mm de longitud cabeza-cloaca) y alcanza un máximo de 820 mm (Boscá, 1879; Tourneville, 1881; Saint-Girons, 1978a). La cola es corta proporcionalmente al resto del cuerpo, representando aproximadamente el 15% y el 12% de la longitud total en los machos y en las hembras, respectivamente (Saint-Girons 1957, 1958; Bea, 1997).

Folidosis

Presenta dos o tres escamas apicales, dos cantales (raramente tres), una media de 5.25 loreales, una media de 10.05 perioculares, de 9 a 10 labiales superiores, dos hileras de pequeñas escamas entre el ojo y las escamas labiales superiores, y una elevada fragmentación de las placas cefálicas (24-38 escamas intercantales + intersupraoculares) (Saint-Girons, 1978a). Hay 21 hileras de escamas dorsales alrededor del cuerpo, en ocasiones 19 o 23 (Saint-Girons, 1978a). Las hembras presentan entre 137-159 escamas ventrales y 27-42 pares de escamas subcaudales, mientras que los machos muestran 136-158 ventrales y 22-50 pares de subcaudales (Saint-Girons, 1978a; Saint-Girons et al., 1983). El número de escamas ventrales es un carácter variable y específico de las diferentes subespecies que actualmente se reconocen en *V. aspis* (Zuffi, 2002).

Patrones de coloración

Se trata de una especie con grandes variaciones en cuanto a sus patrones de coloración (Bruno, 1985). La cabeza es muy variable, en algunos ejemplares es lisa, sin marcas, en otros aparecen marcas finas o en forma de lágrimas y manchas redondeadas, en otros aparecen marcas más elaboradas, lineares o curvilíneas, marcas en forma de tridente, de X, de V o de S, e incluso se puede dar una combinación de varios diseños (Mallow et al., 2003). La coloración dorsal del cuerpo es también muy variable. Ésta ha sido ilustrada por Bruno (1985), quien reconoce una variación del color dorsal desde el claro hasta el totalmente oscuro (incluyendo tonos grises, rojizos, verde-oliváceos... etc.), con una gran variedad de diseños con rayas horizontales, rayas verticales, barras horizontales sobre una línea vertebral, puntos, manchas ovales o romboidales más o menos conectadas o un zigzag anguloso.

Las variaciones del diseño dorsal descritas en su área de distribución Ibérica son las siguientes (Bea, 1997):

- i) línea vertebral ancha y oscura bordeada de pequeñas manchas también oscuras formando un zigzag redondeado, descrito para las poblaciones del Pirineo central (Kramer, 1958; Duguy & Saint-Girons, 1970; Saint-Girons et al., 1983);
- ii) barras estrechas sobre una línea vertebral fina o un diseño en zigzag de tipo anguloso (Fig. 2), descrito para las poblaciones del resto de Iberia (Phisalix, 1968; Bruno, 1976; Duguy et al., 1979).

Variación geográfica

La víbora áspid es una especie politípica y polimorfa, con variaciones geográficas muy importantes, lo que ha llevado a la descripción de seis subespecies en diferentes regiones (Golay et al.,

1993; McDiarmid et al., 1999):

- 1) *V. aspis aspis* (Linnaeus, 1758), en el norte y centro de Francia;
- 2) *V. aspis francisciredi* Laurenti, 1768, en el norte y centro de Italia;
- 3) *V. aspis atra* Meisner, 1820, en el centro-oeste de Suiza, noroeste de Italia y sureste de Francia;
- 4) *V. aspis hugyi* Schinz, 1833, en el sur de Italia y Sicilia;
- 5) *V. aspis montecristi* Mertens, 1956, en la isla de Montecristo y el archipiélago Toscano (Italia);
- 6) *V. aspis zinnikeri* Kramer, 1958, en el sur y suroeste de Francia y noreste de España.

La existencia de la subespecie *montecristi* ha sido debatida en varios trabajos (Pozio, 1980; Corti et al., 1991; Golay et al., 1993; McDiarmid et al., 1999; Zuffi y Bonnet, 1999) que han concluido que es sinónima de la subespecie *hugyi*. De hecho, Barbanera et al. (2009) han comprobado que las poblaciones de *V. aspis* de la isla de Montecristo son genéticamente idénticas a las poblaciones de *V. aspis hugyi* de Sicilia, achacando la existencia de estas poblaciones a introducciones humanas durante los siglos VIII – III AC por parte de la Milicia de la Magna Grecia.

Recientemente, las restantes cinco subespecies han sido revisadas a fondo por medio de estudios morfológicos y moleculares que, sin embargo, no ofrecen resultados congruentes (Zuffi, 2002; Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006; Golay et al., 2008; Barbanera et al., 2009). Los estudios morfológicos, en base a diferencias en el número de escamas ventrales, número de marcas dorsales y morfología de los hemipenes, abogan por la elevación de las subespecies *atra*, *hugyi* y *zinnikeri* a rango específico (Zuffi, 2002). Los moleculares, establecen la existencia de dos clados separados por la cordillera de los Alpes, que están compuestos a su vez por dos sub-clados cada uno, con distribución parapátrica, pero con zonas de hibridación e introgresión genética: clado del oeste, que incluye los sub-clados *aspis*, sinónima de *atra*, y *zinnikeri*, y clado del este, que incluye los subclados *francisciredi* y *hugyi* (Zuffi et al., 2001; Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006; Barbanera et al., 2009). No obstante, parece claro que *V. aspis atra* es sinónimo de *V. aspis aspis* (Ursenbacher et al., 2006; Barbanera et al., 2009).

En la península Ibérica, aunque tradicionalmente se ha reconocido la existencia de dos subespecies *V. aspis zinnikeri* en los Pirineos centrales y *V. aspis aspis* en el resto del área (Bea, 1997; Gosá, 2002; Mallow et al., 2003; Kreiner, 2007), los actuales estudios morfológicos y moleculares concuerdan en la existencia de una sola subespecie, *V. aspis zinnikeri*, ocupando todo el área de distribución ibérica (Zuffi, 2002; Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006). Duguy et al. (1979) han descrito convergencia morfológica de esta especie con *V. seoanei* en las zonas de contacto del País Vasco y los Pirineos atlánticos, y con *V. latastei*, especie hermana filogenéticamente, en la zona de contacto de la sierra de la Peña (Navarra-Huesca).

Figura 3. Área de distribución de *Vipera aspis*, con las zonas que ocupan cada subespecie. Adaptado de Gasc et al. 1997 y Ursenbacher et al. 2006.

Distribución

V. aspis es una especie centroeuropea meridional, distribuida por el oeste de la región mediterránea, incluyendo toda Italia (también las islas de Elba, Montecristo y Sicilia), noroeste de Eslovenia, la mitad oeste de Suiza, el borde oeste de Alemania, Mónaco, el centro y sur de Francia, Andorra y el sector nororiental de España (Saint-Girons, 1980a; Rage & Saint-Girons, 1986; Bea, 1997; Gasc et al., 1997; Mallow et al., 2003; Kreiner, 2007).

En España está presente en los Pirineos, prácticamente en toda la zona pre-pirenaica, desde Barcelona hasta el norte de Burgos, el valle del Ebro en sus tramos alto y medio, y el sistema Ibérico septentrional (sierras de la Demanda y de Urbión) (Maluquer, 1917; Salvador et al., 1970; Palaus, 1974; González, 1977; Duguy et al., 1979; Escala & Pérez-Mendía, 1979; Bergerandi, 1981; Escala & Jordana, 1982; Martínez-Rica, 1983; Vives-Balmaña, 1984, 1990; Bea, 1985a, 1985b, 1997; Falcón & Clavel, 1987; Barbadillo, 1987; Zaldívar et al., 1988; Gosá, 1997, 2002; Barbadillo et al., 1999).

Hábitat

Se trata de una especie con una capacidad del uso del hábitat notable, ocupando una amplia variedad de biotopos, desde bosques de coníferas, encinas, melojos, quejigos, y pinares, hasta prados de montaña y pastizales subalpinos (Barbadillo, 1987; Barbadillo et al., 1999; Gosá, 1997, 2002). Sin embargo, sus requerimientos térmicos la llevan a utilizar en general hábitats provistos de sus-

Figura 4. Árbol de máxima probabilidad para *V. aspis* basado en secuencias de ADN mitocondrial. Adaptado de Ursenbacher et al. 2006.

trato pedregoso, con suelos relativamente secos, bien insolados, orientados al sur y con cierta cobertura de vegetación: taludes y setos, muros de separación de campos, canchales y pedrizas, argomales, brezales, bordes de bosque, e incluso, bosques de ribera y pequeños humedales durante el verano (Duguy, 1972; Duguy et al., 1979; Saint-Girons, 1980a; Bea 1985a, 1985b; Luiselli & Rugiero, 1990; Monney, 1992; Gosá, 1997, 2002).

En la península Ibérica su rango de variación altitudinal va desde las proximidades del nivel del mar hasta más de 2.000 msnm en el Sistema Ibérico y 2.900 msnm en el Pirineo central (Duguy, 1972; Bea, 1997; Barbadillo, 1987; Barbadillo et al., 1999; Gosá, 1997, 2002).

Cuando coincide con la víbora de Seoane prefiere las zonas más soleadas y menos húmedas; cuando lo hace con la víbora hocicuda selecciona zonas más altas y frescas, aunque las preferencias de hábitat de las dos especies pueden llegar a ser muy parecidas dándose casos de zonas de simpatria (Duguy et al., 1979; Bea, 1985b; Barbadillo, 1987; Barbadillo et al., 1999; Gosá, 1997, 2002).

Monney (1992) ha descrito diferentes usos del hábitat durante el ciclo anual para *V. aspis* en una zona prealpina de Suiza: tanto machos como hembras no reproductoras usan preferentemente las zonas pedregosas durante el verano, mientras que durante la hibernación se refugian en bosques de hoja caduca o en proceso de regeneración. Luiselli y Filippi (2006) han encontrado que en el centro de Italia *V. aspis* suele ocupar las áreas de matorral espinoso, las zonas con árboles caídos, ciertas zonas de actividad antropogénica, como muros de fincas, y áreas con elevada densidad de lagartos.

Actividad

Al igual que otras especies de amplia distribución, el período de actividad para *V. aspis* varía con la altitud, la latitud y las condiciones climáticas locales. De forma general la actividad se inicia en febrero-marzo para los machos y tres semanas más tarde para las hembras, prolongándose hasta mediados o finales de octubre (Duguy, 1958, 1963; Saint-Girons, 1952, 1957, 1975; Moser et al., 1984; Monney, 1990a, 1992). En las poblaciones de las zonas montañosas más altas, como los Pirineos y los Alpes, el período de actividad es más corto y dura unos 6 meses (Duguy, 1972; Monney, 1990a, 1992), mientras que en las poblaciones de las zonas costeras del centro de Italia el período de actividad es más largo, ya que las víboras suelen estar activas durante los inviernos más cálidos (Zuffi, 1999; Zuffi et al., 1999).

En las zonas bajas hiberna aisladamente, mientras que en montaña pueden agruparse varios individuos (Duguy, 1963). Es una especie con actividad diurna (Saint-Girons, 1952; Naulleau, 1968), aunque en verano y en días con temperatura muy elevada presenta actividad nocturna (Naulleau, 1975; Zuffi, 1999). Presenta un ritmo circadiano de actividad unimodal en primavera y otoño y bimodal en verano (Saint-Girons, 1952; Naulleau, 1965, 1966a, 1975; Zuffi, 1999).

El ciclo de muda varía en función de la edad, el sexo y el estado reproductor (Saint-Girons, 1980b):

- i) en los neonatos se producen cuatro mudas anuales;
- ii) en los inmaduros se producen tres mudas anuales a principios de mayo, en junio-julio y a principios de agosto;
- iii) en los machos adultos se producen dos (*V. aspis zinnikeri*) o tres mudas anuales (*V. aspis aspis*), siendo la primera siempre postnupcial, ocurriendo en mayo, la segunda en julio y la tercera en agosto; parece que las poblaciones de montaña de *V. aspis zinnikeri* también pueden realizar una tercera muda entre agosto y septiembre (Duguy, 1972);
- iv) en las hembras reproductoras se producen dos mudas al año en junio y en agosto;
- v) en las hembras en estado de reposo reproductor se producen dos mudas en mayo-junio y en agosto (normalmente antes que las hembras reproductoras) o incluso tres, en junio, en julio-agosto y en septiembre, en las poblaciones con ciclos de reproducción trianual.

No existen datos referentes al período de actividad anual, ritmo circadiano y ciclos de muda para las poblaciones de la península Ibérica.

Reproducción

El ciclo espermatogénico de los machos de tipo mixto (Saint-Girons, 1957, 1976, 1982, 1992; Nilson & Andrén, 1997). La espermacitogénesis es única y postnupcial, produciéndose a finales de

verano, mientras que la espermiogénesis se produce en dos períodos, a finales de verano y a principios de primavera, lo que posibilita la existencia de dos períodos de acoplamiento (Saint-Girons, 1982, 1992; Nilson & Andrén, 1997; Bea, 1997), uno en primavera (abril-mayo), que es el principal, dura unas tres o cuatro semanas, aunque su inicio y finalización dependen de las condiciones meteorológicas y la altitud; y otro en otoño (septiembre-octubre), pero parece que tiene una incidencia baja, ya que no todos los machos participan en él y su duración es más corta (Bea, 1997). En los Pirineos no parece existir segundo período de acoplamiento (Saint-Girons, 1957, 1974), sin embargo, este sí ocurre en la región pre-alpina de Suiza (Moser et al., 1984; Monney, 1990a).

Las hembras presentan un único período de ovulación durante la primera quincena de junio, produciéndose éste independientemente de los factores externos; la vitelogénesis se produce durante la primavera (Saint-Girons, 1957; Naulleau, 1981). Ésta se induce una vez que se ha alcanzado un determinado y elevado nivel de reservas en los cuerpos grasos abdominales y el hígado (“capital breeders”) (Bonnet et al., 1992, 1994). Por ello, los ciclos reproductores de las hembras varían de una región a otra, pudiendo ser bianuales, trianuales y también cuatrianuales, pero rara vez anuales (Saint-Girons, 1957, 1981, 1994; Saint-Girons & Duguy, 1992; Zuffi et al., 2009).

V. aspis es una especie ovovivípara, en la que la gestación de las hembras se prolonga durante dos o tres meses y su duración guarda estrecha relación con la temperatura: 92.3 días a 26°C, 74.3 a 28°C y 59.5 a 31°C (Naulleau, 1986). Además, la temperatura ambiental durante la gestación repercute en los fenotipos de las crías (Lourdais et al., 2004). En función de las condiciones climatológicas y la altitud, los partos se pueden producir en agosto o prolongarse hasta finales de octubre, aunque lo general es que sean en septiembre (Saint-Girons, 1957, 1981; Naulleau, 1981). El número medio de crías por parto es de 6.6 para *V. aspis aspis* y 7.7 para *V. aspis zinnikeri* (Saint-Girons & Naulleau, 1981; Naulleau & Bonnet, 1995), aunque de forma excepcional se ha señalado un parto de 22 viboreznos (Naulleau, 1976). Su tamaño y peso medio son de 196 mm y 5.4 g para *V. aspis aspis* y de 179 mm y 4.2 g para *V. aspis zinnikeri*; el peso total de la camada en relación al peso de la madre representa como media el 43.87% y el 46.35%, respectivamente, para cada subespecie (Saint-Girons & Naulleau, 1981). El peso de la madre, sin la camada y los cuerpos grasos, y su longitud cabeza-cloaca están positivamente correlacionados con el peso total y el peso medio de la camada, respectivamente (Bonnet et al., 1992; Saint-Girons & Duguy, 1992).

No existen datos referentes a la reproducción de *V. aspis* para la península Ibérica.

Ecología trófica

Se trata de un depredador diurno que caza al acecho (Bea et al., 1992). Para los adultos, los micromamíferos constituyen sus presas principales, suponiendo en torno a un 97.8% en biomasa total

y siendo los roedores el grupo predominante (Tabla 1) (Bea et al., 1992). Existen marcadas diferencias entre sus poblaciones, que afectan básicamente a la proporción en que participan los distintos grupos de micromamíferos (Saint-Girons, 1971; Capula & Luiselli, 1990; Monney, 1990a; Luiselli & Agrimi, 1991; Bea et al., 1992; Saviozzi & Zuffi, 1997). Además también depredan sobre reptiles (Tabla 1) y aves (Roulin, 1988); en las poblaciones suizas pre-Alpinas, se ha registrado la inclusión en la dieta de anfibios (*Rana temporaria*) (Monney, 1993).

No existen diferencias en la composición de la dieta entre machos y hembras. Sin embargo, se han registrado variaciones ontogénicas de la composición de la dieta: los ejemplares inmaduros consumen casi exclusivamente reptiles, mientras que los adultos consumen fundamentalmente micromamíferos, aunque también aceptan algunos reptiles (Saint-Girons, 1980c; Luiselli & Agrimi, 1991; Bea et al., 1992). reptiles (Tabla 1) y aves (Roulin, 1988); en las poblaciones suizas pre-Alpinas, se ha registrado la inclusión en la dieta de anfibios (*Rana temporaria*) (Monney, 1993).

La frecuencia e intensidad de alimentación varía en esta especie a lo largo del ciclo anual y en función del sexo, estado reproductor, edad y ciclo de muda (Saint-Girons, 1979): i) los inmaduros se alimentan prácticamente a lo largo de todo el ciclo anual, desde y hasta una o dos semanas tras y antes de la hibernación; ii) los machos adultos se alimentan transcurrida la primera muda hasta aproximadamente una semana antes de la hibernación; iii) las hembras adultas en fase reproductora se alimentan tras los acoplamientos hasta la ovulación y vuelven a alimentarse tras los partos

Tabla 1. Frecuencia de los diferentes tipos de presa en la dieta de *V. aspis*. Referencias: 1. Saint-Girons 1971, 2. Monney 1990a, 3. Luiselli & Agrimi 1991.

	1 Loira atlántico, NO Francia	2 Zona pre-alpina, Suiza	3 Montañas de Tolfa, Italia central.	
			< 34 cm	> 34 cm
Scincidae	-	-	3.8	-
Lacertidae	-	-	76.9	9.2
Total Reptiles	7.8	-	80.7	9.2
Aves	-	2.3	-	9.2
Soricidae	20	13.95	-	35.1
Talpidae	-	-	-	6.1
Gliridae	-	-	-	1
Cricetidae	57.8	79.07	-	5.2
Muridae	14.4	4.6	19.2	32.9
Mustelidae	-	-	-	1
Total Mamíferos	92.2	97.7	19.2	81.3

hasta una o dos semanas antes del comienzo de la hibernación; iv) las hembras adultas no reproductoras se alimentan transcurrida una semana después de la hibernación hasta los acoplamientos otoñales (cuando existen).

La ración alimenticia anual es baja y varía también en función de la edad, sexo y estado reproductor, siendo un 212-310% del peso en caso de los machos adultos, un 55% en caso de las hembras reproductoras, entre un 250-300% en caso de las hembras adultas no reproductoras y hasta un 800% en caso de los neonatos e inmaduros (Saint-Girons, 1979; Bea et al., 1992).

No existen datos específicos sobre la dieta de *V. aspis* en la península Ibérica.

Demografía

Para las poblaciones francesas, el crecimiento de los machos se efectúa rápidamente hasta los cuatro o cinco años de edad, momento en el que se alcanza la maduración sexual, mientras que en las hembras el crecimiento es algo más lento que en los machos, hasta que alcanzan la maduración sexual a los cuatro o seis años de edad (Saint-Girons, 1957, 1958). Sin embargo, para una población del centro-oeste de Francia, se ha señalado un crecimiento más acelerado para las hembras entre los primeros 3-4 años de edad, momento en el que ocurre la maduración sexual (Bonnet et al., 1999). La talla de maduración sexual está comprendida entre los 400-500 mm para los dos sexos (Saint-Girons, 1957, 1958) y 410 mm en el caso de las hembras del centro-oeste de Francia (Bonnet et al., 2001a,b). Tras la maduración sexual el crecimiento es del 1.7% y 1.2% anual para los machos y las hembras, respectivamente (Saint-Girons, 1957, 1958). Mediante el uso de técnicas de esqueleto-cronología se ha señalado una longevidad de 18 años (Castanet, 1974; Castanet & Naulleau, 1974, 1982).

Para la región del oeste de Francia la proporción de sexos es muy similar, aunque parece que los machos superan ligeramente a las hembras (Saint-Girons, 1994). En períodos de tiempo más cortos la proporción de sexos varía de forma significativa, dominando los machos en primavera y las hembras en verano. Además, las hembras reproductoras son más abundantes (2/3) al inicio del ciclo anual de actividad, mientras que a finales de ciclo anual son las no reproductoras las más frecuentes (2/3). En conjunto, las hembras reproductoras representan 1/3 del total de hembras adultas (Saint-Girons, 1994). Para la población de la región pre-Alpina suiza llega a alcanzarse una proporción 1/4 a favor de las hembras gestantes en verano (Monney, 1992). La densidad de población estimada para el oeste y centro de Francia es de 16.11 ejemplares por ha (Naulleau & Bonnet, 1995). No existen estimaciones de densidad para las poblaciones ibéricas, aunque donde existe es una especie relativamente abundante (Barbadillo et al., 1999).

Termorregulación

La temperatura mínima voluntariamente tolerada es de 11.0-11.5° C; la temperatura preferida de una víbora sin presa y no gestante es de unos 30.5° C y el máximo voluntariamente tolerado varía entre 32.0 y 37.0° C; la temperatura preferida a lo largo de la digestión es algo menor (Duguy, 1963, 1972; Saint-Girons, 1975, 1978b; Naulleau, 1979). *V. aspis* no acepta presas por debajo de 15° C. La duración de la digestión sigue una función inversa al aumento de la temperatura, aunque parece que los machos digieren las presas más rápidamente que las hembras (Naulleau, 1982, 1983). Se ha comprobado que en las hembras la duración de la gestación guarda estrecha relación con la temperatura (Naulleau, 1986).

No existen datos sobre termorregulación en *V. aspis* para la península Ibérica.

Dominio vital

Aunque presenta importantes diferencias individuales y poblacionales, los machos se desplazan a lo largo del año más que las hembras. Naulleau (1966) refiere una distancia anual media de 884 m para 35 machos y 377 m para 15 hembras, mientras que Saint-Girons (1997) reseña una distancia anual media de 259 m para 18 machos y 178 m para 16 hembras. El dominio vital difiere notoriamente entre ambos sexos: 2.800 – 2.940 m² para los machos y 1.200 - 1.770 m² para las hembras (Naulleau, 1966; Moser et al., 1984). No obstante se ha señalado que las hembras gestantes no se suelen desplazar tras la hibernación a los lugares de alimentación y efectúan los partos en las proximidades de los refugios de hibernación (Duguy, 1963). Monney (1992) refiere un desplazamiento anual de 200 m y un dominio vital de 4.237 m² para una hembra gestante en la región pre-Alpina del oeste de Suiza, mientras que Naulleau et al. (1996) describen un dominio vital medio de 3.715 m² para 19 hembras gestantes en el centro-oeste de Francia.

No existen datos sobre dominio vital de *V. aspis* en la península Ibérica.

Estatus de conservación

La categoría para esta especie en la lista roja de la UICN es LC “Preocupación menor”, debido a su amplia distribución, su gran tolerancia que la lleva a usar multitud de hábitats y ya que, presuntamente, existe en grandes poblaciones (Corti et al., 2006). La subespecie *V. aspis aspis* está categorizada como CR “críticamente amenazada” en Suiza, *V. aspis atra* como VU “vulnerable” y *V. aspis francisciredi* como EN “amenazada” (Monney & Meyer, 2005). También figura en el Anexo III de la Convención de Berna y en el Anexo IV de la Directiva de Habitat y Especies de la Unión Europea (Pleguezuelos et al., 2002; Corti et al., 2006).

Aunque no se han realizado estudios concretos, en España la víbora áspid se encuentra catalogada como LC “Preocupación menor” en el “Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España”, pues está presente en una amplia variedad de biotopos, incluyendo zonas de alta montaña (Pleguezuelos et al., 2002). Sin embargo, la especie no aparece catalogada en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (CNEA, 2008).

Amenazas

De forma general, *V. aspis* es una especie amenazada por la pérdida de hábitat debido a la intensificación de la agricultura y por el desarrollo de infraestructuras para el turismo y la urbanización. La especie ocurre en áreas abiertas de matorral, con lo que el abandono del campo y la reforestación con coníferas es también una amenaza, ej. en las montañas del Jura en Suiza (Jaggi & Baur, 1999). Además, es perseguida por el hombre e ilegalmente capturada para el comercio de mascotas (Corti et al., 2006).

Actualmente, el conjunto de la población ibérica de *V. aspis* no parece presentar problemas de conservación. El descenso de efectivos apreciable en algunas áreas humanizadas, debido a la fragmentación y destrucción del hábitat, contrasta con el incremento poblacional que parece detectarse en su extremo suroriental de distribución (El Corredor y Montseny) (Gosá, 2002; Pleguezuelos et al., 2002).

Como todas las serpientes, es sensible a la muerte directa por parte del hombre en el medio rural. Sin embargo, el abandono de las tierras de cultivo en zonas de montaña ha debido paliar los posibles efectos que este hábito tan extendido ha debido tener localmente sobre las poblaciones (Gosá, 2002). Los atropellos suponen una causa de mortalidad no natural que va en incremento a medida que se construyen nuevas carreteras o se aumenta el tráfico rodado por éstas.

Víbora hocicuda - *Vipera latastei* Boscá, 1878

Figura 5. Varios ejemplares de *Vipera latastei latastei* del Noroeste de la provincia de Burgos: dos machos adultos (A y F), dos hembras adultas (B y G), varios juveniles recién nacidos (E), detalle lateral de la cabeza de una hembra adulta (C) y detalle dorsal de la cabeza de una hembra adulta (D).

Identificación

V. latastei es un vipérido de mediano tamaño, con el cuerpo relativamente grueso y la cola proporcionalmente corta, entre el 11 y el 15% de la longitud total (Fig. 1 y 5) (Bea & Braña, 1997), normalmente más larga en los machos que en las hembras (Brito et al., 2006). La cabeza está muy ensanchada posteriormente (lo que le da un aspecto triangular), está bien diferenciada del cuerpo y presenta un apéndice nasal prominente y dirigido hacia arriba (Bea & Braña, 1997).

La longitud total máxima registrada, pertenece a un macho recogido en las islas Columbretes con 720 - 730 mm (Bernis, 1968). En Galicia la longitud máxima se corresponde con un macho de 635 mm (Galán & Fernández-Arias, 1993). La mayoría de los individuos varían entre los 500 mm y los 600 mm de longitud total (Steward, 1971; González, 1977; Saint-Girons, 1977, 1978a; Vives-Balmaña, 1987; Brito & Rebelo, 2003). Un reciente estudio realizado con víboras en colección de todo su área de distribución ha mostrado que no existe dimorfismo sexual en cuanto a la longitud cabeza – cloaca, las hembras miden una media de 406.8 mm, mientras que los machos 404.4 mm,

sin embargo, en algunas poblaciones los machos parecen alcanzar mayor tamaño que las hembras (Brito et al., 2006).

Folidosis

Tradicionalmente se considera que presenta entre tres y siete escamas apicales (Bea & Braña, 1997; Braña, 1997a), sin embargo, Brito et al. (2006) han encontrado ejemplares con dos, ocho y nueve escamas apicales, así como dimorfismo sexual en este rasgo morfológico (media en hembras = 5.1, media en machos = 4.7). Presenta dos escamas cantales (excepcionalmente tres), de cinco a 12 loreales, de seis a 12 perioculares, de nueve a 10 labiales superiores y 11 a 13 labiales inferiores (Bea & Braña, 1997; Brito et al., 2006). Entre el ojo y las escamas labiales superiores presenta generalmente dos hileras de pequeñas escamas, raramente tres (Bea & Braña, 1997). La placa frontal y las parietales están parcialmente (45% y 14% de los individuos analizados respectivamente, $n=31$; Saint-Girons, 1978a) o totalmente fragmentadas (55% y 86% de los individuos analizados respectivamente; $n=31$, Saint-Girons, 1978a) y el número de intercantales más intersupraoculares varía entre 25 y 57 (Bea & Braña, 1997), siendo este carácter también dimórfico (media en hembras = 36.1, media en machos = 34.8) en las víboras hocicudas de la península (Brito et al., 2006).

Las escamas dorsales son carenadas y están dispuestas en 19 o 21 hileras en el centro del cuerpo. El número de escamas ventrales tiende a ser mayor en las hembras (123 a 150) que en los machos (124 a 153), pero las diferencias no son significativas (Saint-Girons, 1977, 1978a; Brito et al., 2006). Los ejemplares de la península presentan dimorfismo sexual en cuanto al número de pares de escamas subcaudales (media en hembras = 34.6, media en machos = 41.4) (Brito et al., 2006).

Patrones de coloración

La coloración es menos variable que en las otras especies europeas (Boscá, 1879; Bernís, 1968; Saint-Girons, 1977, 1978a; Galán, 1983). La coloración de fondo es ceniciento oscuro hasta marrón, de acuerdo con las poblaciones. En la región dorsal de la cabeza presenta frecuentemente dos bandas oscuras oblicuas, que pueden unirse en la zona anterior, formando una V invertida (Fig. 5D). La zona dorsal está cubierta por una banda vertebral, que puede formar un dibujo en zigzag, o una sucesión de manchas romboidales, tanto interconectadas como aisladas (Fig. 5). El color de la banda vertebral varía entre ceniciento y pardo, pero generalmente es más oscura que la coloración de fondo del dorso y está bordeada de negro (Bea & Braña, 1997). Raramente puede ser totalmente negra, es decir melánica (Brito, 2001). La extremidad de la cola puede ser amarilla o negra (Parellada & Santos, 2002). El dicromatismo sexual es reducido (Shine & Madsen, 1994),

sin embargo, los machos presentan una coloración más oscura y contrastada que las hembras.

Variación geográfica

Actualmente se considera que las poblaciones de *Vipera latastei* se reparten en dos subespecies (Figura 6):

- i) *Vipera latastei latastei* Boscá, 1878. Se encuentra en el norte de Portugal (al norte del río Mondego), centro y este de España, descendiendo hasta Sierra Nevada. Presenta 21 hileras de escamas dorsales, 135 a 147 escamas ventrales, y la escama frontal está frecuentemente poco fragmentada y tiene forma de un pequeño escudo (Saint-Girons, 1977, 1978a);
- ii) *Vipera latastei gaditana* Saint-Girons, 1977. Se encuentra en el sudoeste de la Península Ibérica y en el extremo norte de África, desde Marruecos hasta Túnez. Presenta 21 (raramente 23) hileras de escamas dorsales, 122 a 138 escamas ventrales, y las escamas cefálicas están totalmente fragmentadas (Saint-Girons, 1977, 1978a).

Los trabajos más recientes sobre variación morfológica de esta especie en todo su área de distribución (Brito et al., 2006, 2008a) han encontrado una diferenciación morfológica importante entre las poblaciones del este de la península - norte de África y las del oeste - centro de la península, sugiriendo que la taxonomía intraespecífica de esta especie debería ser revisada.

Por otra parte, Duguy et al. (1979) han descrito convergencia morfológica -en cuanto a diseño dorsal y a la elevación del hocico- de esta especie con *V. aspis* en la zona de contacto de la sierra de la Peña (Navarra-Huesca). Además, Brito et al. (2006, 2008a) han señalado que las poblaciones del noreste de la península presentan características morfológicas –número de marcas dorsales y escamas ventrales- que se alejan del patrón normal para la especie, sospechando que sea debido a un fenómeno de introgresión genética de *V. aspis*.

Distribución

V. latastei se encuentra en la mayor parte de la Península Ibérica, exceptuando una estrecha franja en el norte, y en el norte de África, en las áreas costeras de Marruecos, Argelia y Túnez, la cadena montañosa del Rif y el Medio Atlas (Fig. 6) (Bons & Geniez, 1996; Schleich et al., 1996; Bea & Braña, 1997; Pleguezuelos & Santos, 1997, 2002; Fahd & Pleguezuelos, 2001; Ferrand de Almeida et al., 2001; Fahd et al., 2005, 2007; Brito, 2008a; Brito et al., 2008b). Se conocía una única población insular, en las Islas Columbretes (Mar Mediterráneo), pero fue extinguida a mediados del siglo XIX (Bernís, 1968).

En España, se distribuye al sur de Galicia y al sur de las cordilleras Cantábrica y Pirenaica, estando ausente en los extremos septentrionales de las provincias de León, Palencia y Burgos, y por

Figura 6. Área de distribución de *Vipera latastei*, con las zonas que ocupa cada subespecie. Adaptado de Gasc et al. 1997 y Brito et al. 2006.

todo el País Vasco. Parece ser frecuente en regiones montañosas (sierras de La Cabrera, La Culebra, Sistema Ibérico, Sistema Central, Sierra Morena y Sierras Béticas) y en regiones relativamente deshabitadas (Burgos y Montes de Toledo) (Bea & Braña, 1997; Pleguezuelos & Santos, 1997, 2002). En Portugal se encuentra en todo el territorio, pero en poblaciones dispersas y aisladas, de una forma general restringida a las zonas montañosas (Crespo & Oliveira, 1989; Crespo & Sampaio, 1994; Malkmus, 1995; Godinho et al., 1999; Ferrand de Almeida et al., 2001; Brito, 2008a). De una forma general, tanto en la Península Ibérica como en el norte de África, *V. latastei* presenta una distribución discontinua, con núcleos poblacionales dispersos y aislados, con densidades moderadas o bajas. Probablemente su área de distribución en el pasado fue de mayores dimensiones, pero actualmente las poblaciones están fragmentadas y aisladas (Saint-Girons, 1980a; Escarré & Vericad, 1981; Pérez-Mellado, 1983; Vives-Balmana, 1987; Parellada, 1995a, 1998; Bons & Geniez, 1996; Schleich et al., 1996; Galán, 1999; Fahd & Pleguezuelos, 2001; Pleguezuelos & Santos, 2002; Santos et al., 2006).

Hábitat

Es una especie típica de regiones de clima mediterráneo, de tipo húmedo, subhúmedo o semiárido (Bea & Braña, 1997; Pleguezuelos & Santos, 2002). De hábitos saxícolas, ocupa zonas rocosas secas, frecuentemente cubiertas por matorrales, bosques, taludes escarpados y muros de piedra con alguna vegetación que separan los campos de cultivo y pastizales (Stewart, 1971; Saint-Girons,

1980a; Barbadillo, 1987; Crespo & Sampaio, 1994; Schleich et al., 1996; Bea & Braña, 1997; Barbadillo et al., 1999; Galán, 1999; Brito, 2003a). También está presente en zonas abiertas de bosques de robles, coníferas, alcornoques y encinas o bosques mixtos, que contengan sitios propicios para refugio, termorregulación e hibernación. También puede estar presente ocasionalmente en pinares arenosos litorales y en zonas arenosas casi sin vegetación arbustiva, tales como las dunas costeras del Parque Nacional de Doñana o el cabo de Gata (Valverde, 1967).

El radio-seguimiento de siete machos adultos durante un año en un área de 22.4 ha del Parque Nacional da Peneda-Gerês (norte de Portugal), permitió verificar que hay variaciones estacionales en los tipos de hábitats y microhábitats utilizados (Brito, 2003a). A lo largo del año, las víboras se encuentran más frecuentemente en hábitats de bosques abiertos con matorrales en detrimento de matorrales puros. Sin embargo, en verano se mueven hacia las márgenes de ríos e invernan en áreas de bosques menos abiertos. En cuanto a las variaciones estacionales en los microhábitats utilizados, se detectó que: (1) en primavera prefieren las áreas con elevada cobertura de arbustos y sus proximidades; (2) en verano pasan mucho tiempo bajo arbustos en áreas con muchos troncos o en las proximidades del agua; (3) en otoño prefieren quedarse cerca de rocas y troncos (Brito, 2003a).

Se encuentra desde el nivel del mar hasta los 2.780 m en las sierras Béticas orientales españolas (Pleguezuelos, 1986) y hasta los 2.000 m en el Yebel Bouhalla en Marruecos (Bons & Geniez, 1996; Fahd & Pleguezuelos, 2001).

El período de actividad de esta especie se prolonga desde febrero/marzo hasta octubre/noviembre (Brito, 2003a); sin embargo, en las regiones con inviernos suaves, el ciclo anual de actividad probablemente no se interrumpe (Crespo, 1973). Normalmente no se agrega para hibernar, pero se ha detectado un grupo de 15 individuos durante la hibernación (Barbadillo, 1987). Parellada (1995b, 1998) y Brito (2003a) refieren para Cataluña y norte de Portugal (Parque Nacional da Peneda-Gerês), respectivamente, que el pico anual de observaciones de víboras es en septiembre y octubre, durante la época de reproducción. Es una especie diurna, pero en los meses más calurosos adquiere hábitos crepusculares o nocturnos (Maluquer, 1917; Valverde, 1967; Brito, 2003a).

Los inmaduros y recién nacidos mudan la piel más frecuentemente que los adultos (Saint-Girons, 1980b; Brito, 2003a). Los adultos mudan la piel dos veces al año, los machos en junio y finales de agosto, y las hembras en junio y finales de julio o principios de agosto. Los inmaduros y recién nacidos mudan la piel tres veces al año – junio, julio y agosto (Brito, 2003a).

A través de un estudio de radio-telemetría en el norte de Portugal (Parque Nacional da Peneda-Gerês), se detectó que la actividad anual y diaria está fuertemente influenciada por las condiciones climáticas, especialmente la temperatura y la pluviosidad (Brito, 2003a). En los años con elevada pluviosidad durante marzo, el período de hibernación se extendió hasta finales de este mes.

El período de actividad se prolongó durante todo el mes de noviembre en los años en que la temperatura se mantuvo elevada y la pluviosidad reducida. La temperatura relativamente elevada puede también estimular la actividad en el invierno, pues en algunos días más soleados en que la temperatura ambiente sobrepasa los 10°C es posible observar víboras activas. Sin embargo, temperaturas demasiado elevadas pueden inhibir la actividad. Por ejemplo, durante el verano *Vipera latastei* es más activa durante la noche, pues las temperaturas durante el día son muy elevadas en esta época del año (Brito, 2003a).

Reproducción

Al igual que *V. aspis*, los machos de *V. latastei* presentan un ciclo espermatogénico de tipo mixto, es decir, empieza en verano, se interrumpe durante la hibernación, y recomienza en la próxima primavera (Bons & Saint-Girons, 1982; Saint-Girons, 1982, 1992; Schuett, 1992; Pleguezuelos et al., 2007), lo que permite la existencia de dos épocas de reproducción por año, una en primavera y otra en otoño. La época de reproducción primaveral es obligatoria, mientras que la otoñal es facultativa y dependiente de condiciones meteorológicas favorables (Saint-Girons, 1982, 1992). Sin embargo, Parellada (1995b) y Brito (2003a) han detectado que en Cataluña y norte de Portugal, respectivamente, el período de reproducción es exclusivamente en otoño, no ocurriendo cópulas en primavera. Pleguezuelos et al. (2007) han detectado cópulas tanto en primavera como en otoño en el suroeste de la península Ibérica.

En las hembras la vitelogénesis es postnupcial (Saint-Girons, 1992; Pleguezuelos et al., 2007): los folículos empiezan a crecer a partir del final del verano, con una tasa de crecimiento reducida hasta el inicio de la hibernación, y completan su crecimiento en la próxima primavera hasta alcanzar el estadio de ovario maduro (ovulación) (Seigel & Ford, 1987; Schuett, 1992; Pleguezuelos et al., 2007). La ovulación es regular todos los años y ocurre entre finales de mayo y el inicio de junio (Pleguezuelos et al., 2007). Se trata de una especie ovovivípara, con la fecha del parto variable dependiendo de las condiciones meteorológicas, la altitud y la latitud, registrándose los partos frecuentemente en septiembre, aunque pueden suceder desde mediados de agosto hasta principios de octubre (Crespo & Sampaio, 1994; Pleguezuelos et al., 2007).

Los datos relativos a fecundidad en *V. latastei* son muy variados:

- i) Boscá (1879) reseña la presencia de ocho embriones en el abdomen de una hembra capturada en España;
- ii) Salvador (1974) refiere una media de ocho embriones en los oviductos de un número no referido de hembras capturadas en España;

- iii) Barbadillo (1987) menciona la presencia de cuatro a ocho embriones en un número no referido de hembras capturadas en el Norte de España;
- iv) Saint-Girons y Naulleau (1981) refieren el nacimiento de seis a nueve víboras, con un peso medio de 4.6 g y una longitud total media de 183 mm., para dos víboras capturadas en España y colocadas en condiciones de semi-cautividad fuera de su área de distribución natural. En estos ejemplares el peso de la camada representaba el 52.8% del peso de la hembra después del parto;
- v) Parellada (1995b) reseña 13 recién nacidos, con un peso medio de 6.5 g y una longitud total de 188 mm, de una hembra capturada el Garraf (Cataluña) y colocada en condiciones de semi-cautividad;
- vi) Brito (2003a) refiere una fecundidad potencial (número de folículos desarrollados) de 9.7 individuos por camada (rango: 1-15), en 31 hembras atropelladas en la carretera;
- vii) Pleguezuelos et al. (2007) describen una variación de 2 a 13 individuos por camada (media 7.3) para 20 hembras de la península Ibérica, una longitud cabeza cloaca entre 141- 188 mm (media 158.8 mm) y un peso entre 3.0- 7.5 g (media 5.3 g) para los recién nacidos de 7 camadas. Estos autores también se refieren a dos partos en los que el peso de la camada representaba el 48.3 y 69.0% del peso de dos hembras del Noreste de la península, respectivamente (Pleguezuelos et al., 2007).

En el norte de Portugal (P.N. Peneda-Gerês), en el análisis de 29 ejemplares de hembras sexualmente maduras se detectó una proporción anual de hembras reproductoras cercana al 59%, lo que sugiere una frecuencia de reproducción al menos bianual (Brito, 2003a; Brito & Rebelo, 2003). En un análisis de 17 ejemplares de hembras sexualmente maduras de la colección del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, se verificó que apenas tres contenían embriones, hecho que sugiere también un ciclo reproductor bianual (Bea & Braña, 1997). Sin embargo, el análisis de 73 ejemplares de museo pertenecientes a toda el área de distribución ibérica de la especie detectó 50 víboras no reproductoras, lo que sugiere un ciclo reproductor trianual (Pleguezuelos et al., 2007).

Ecología trófica

Se trata de un depredador esencialmente diurno pero que en los meses más calurosos también caza durante la noche (Bea et al., 1992; Brito, 2003a, 2003b). Su técnica de caza es al acecho y puede utilizar la cola como cebo (Parellada & Santos, 2002).

La composición de la dieta ha sido estudiada por Valverde (1967), a partir de ejemplares de Andalucía, por Bea y Braña (1988) y por Santos et al. (2007), a partir de ejemplares de toda la Península Ibérica y por Brito (2004), en un área de 2.300 ha en el P.N. da Peneda-Gerês, en el norte de

Portugal. De forma general, la dieta es muy variada, incluyendo artrópodos, anfibios, reptiles (principalmente lagartijas), aves y micromamíferos (Tabla 2). Sin embargo, las presas más frecuentes son los reptiles y los micromamíferos (Brito, 2004a; Santos et al., 2007). Algunas presas como los anfibios no forman parte de la dieta en las poblaciones meridionales (Valverde, 1967) y el porcentaje de consumo de micromamíferos en estas poblaciones es inferior a la observada en el norte de Portugal (Brito, 2004a). Probablemente, estas diferencias deben estar relacionadas con diferencias geográficas en la disponibilidad de las presas. En el norte de Portugal, se verificó que las presas más comunes en el área de estudio también eran las presas más frecuentemente consumidas por *V. latastei*.

El estudio de la dieta de los ejemplares de toda la península ha revelado un 46% de víboras con presas en el aparato digestivo, lo que sugiere una baja frecuencia en la actividad alimenticia respecto a otros representantes del género *Vipera* (Santos et al., 2007).

Aunque existen estudios puntuales sobre la dieta de *V. latastei* (Maluquer, 1917; Bernis, 1968; Vericad & Escarré, 1976, López-Jurado & Caballero, 1981), los estudios más detallados (Bea & Braña, 1988; Brito, 2004a; Santos et al., 2007), verifican que la composición de la dieta varía conforme la edad. De forma general, los artrópodos y los reptiles son la principal presa de los inmaduros, mientras que, a medida que las víboras van creciendo van cambiando gradualmente sus preferencias alimenticias hacia los insectívoros y los roedores (Bea & Braña, 1988; Brito, 2004a; Santos et al., 2007).

En el norte de Portugal, así como en el resto de Iberia, no han detectado diferencias sexuales en la composición de la dieta, por tanto el solapamiento del nicho trófico entre machos y hembras es muy elevado (Brito, 2004a; Santos et al., 2007). En ambos estudios, se ha averiguado la existencia de variaciones estacionales en la composición de la dieta: las víboras consumen una proporción creciente de micromamíferos de primavera hasta otoño, mientras que la proporción de reptiles es decreciente a medida que avanza el año (Brito, 2004a; Santos et al., 2007). También se han detectado variaciones estacionales en el número de presas consumidas: las víboras consumen un mayor número de presas durante el verano en el norte de Portugal (Brito, 2004a), mientras que en el resto de Iberia tanto verano como otoño son los principales períodos de alimentación (Santos et al., 2007). Las hembras de *V. latastei* consumen mayor número de presas durante el otoño, probablemente debido a la necesidad de recuperar los cuerpos grasos que han perdido durante la gestación (Santos et al., 2007).

Tabla 2. Frecuencia de los diferentes tipos de presa en la dieta de *V. latastei*. Referencias: 1. Bea & Braña 1988, 2. Santos et al. 2007, 3. Valverde 1967, 4. Brito 2004.

	1 Península Ibérica	2 Península Ibérica	3 ` Andalucía	4 Peneda- Gerês
Mollusca	2.5	-	-	-
Myriapoda	12.5	-	-	-
Coleoptera	-	-	-	4.8
Total Invertebrados	15	3.6	-	4.8
Urodela	-	-	-	1.2
Anura	-	-	-	2.4
Anfibios indet.	-	-	-	1.2
Total de anfibios	-	1.35	-	4.8
Blanidae	2.5	0.45	-	-
Scincidae	-	0.45	-	-
Lacertidae	17.5	31.98	73.34	12.4
Total Reptiles	20	32.88	-	14.4
Aves	7.5	4.95	-	-
Soricidae	27.5	17.11	6.67	21.7
Cricetidae	17.5	19.37	6.67	8.4
Muridae	10	17.56	-	39.8
Mustelidae	2.5	-	-	-
Mamíferos indet.	-	3.15	6.67	6
Total Mamíferos	57.5	57.21	26.66	75.9

Demografía

Estudios realizados en Andalucía y norte de Portugal (P.N. da Peneda-Gerês) han puesto en relieve la ocurrencia de un período de crecimiento rápido hasta la maduración sexual, seguido de una menor tasa de crecimiento (Valverde, 1967; Brito & Rebelo, 2003). A través de un estudio de captura-marcaje-recaptura de 32 ejemplares en el norte de Portugal, Brito y Rebelo (2003) han detectado un crecimiento de 41 a 55 mm al año (en ambos sexos) durante los dos primeros años de vida. Sin embargo, hay una fuerte variabilidad individual en la tasa de crecimiento; así, por ejemplo, en los machos de cuatro años la longitud hocico-cloaca varía entre 280 y 360 mm. Después de alcanzar la madurez sexual, la tasa de crecimiento se reduce mucho, cerca de 20 a 30 mm al año.

La madurez sexual se alcanza a los cuatro años en los machos y a los cinco años en las hembras, ambos sexos con cerca de 350 mm de longitud hocico-cloaca (Brito & Rebelo, 2003). Sin embargo, el análisis de varios ejemplares de museo pertenecientes a toda el área de distribución ibérica

de la especie (Pleguezuelos et al., 2007), revela una talla pequeña y similar de maduración sexual para ambos sexos (240 mm en los machos y 265 mm en las hembras). Por otra parte, en Andalucía la madurez sexual de *Vipera latastei* se alcanza entre los 300-400 mm de longitud total y la longevidad es de nueve años (Valverde, 1967).

En el norte de Portugal se ha detectado que la longevidad de los machos es de 11 años, mientras que la de las hembras es de 14 (Brito & Rebelo, 2003).

Termorregulación

En estudios realizados en cautividad fuera del área de distribución natural de la especie, se registró que: i) la temperatura cloacal de ejemplares observados en abril varía entre 17 y 33°C, con una media de 25.3°C (Naulleau, 1984); ii) su temperatura preferida varía entre 30 y 31°C y la temperatura máxima voluntariamente tolerada es de 34.8°C (Saint-Girons, 1978b). Sin embargo, para la Península Ibérica no existen datos de campo sobre la actividad de termorregulación en *Vipera latastei*.

Dominio vital

El estudio de radio-telemetría de siete machos adultos en el norte de Portugal (P.N. da Peneda-Gerês) detectó que, durante la mayor parte del año, los machos exhibieron movimientos diarios reducidos (media = 3.08 m/día) y presentaron áreas de campeo de pequeñas dimensiones (media = 0.06 ha) (Brito, 2003b). Sin embargo, en septiembre los machos se volvieron extremadamente activos, exhibiendo movimientos diarios amplios y aumentando significativamente las dimensiones de sus áreas de campeo (media = 21.50 m/día y 1.52 ha, respectivamente) (Brito, 2003b). El aumento de los movimientos diarios y de las dimensiones de las áreas de campeo de los machos está relacionado con la época de reproducción. Al igual que otros Vipéridos europeos (ej. Prestt, 1971; Moser et al., 1984; Neumeyer, 1987; Madsen et al., 1993), los machos de *V. latastei* aumentan considerablemente los movimientos diarios y las dimensiones de sus áreas de campeo durante la época de reproducción, buscando hembras reproductoras, llegando a cubrir extensas áreas.

Estatus de conservación

V. latastei figura como NT “Casi Amenazada” en la Lista Roja de las Especies Amenazadas de la UICN, debido a su significativo descenso poblacional (probablemente a un ritmo de menos del 30% durante los últimos 10 años) por la pérdida de hábitats y la persecución directa por parte del hombre (Miras et al., 2006); la especie está próxima a ser clasificada como VU “vulnerable” ya que se espera una reducción poblacional en los próximos años, de hecho, probablemente ya se ha

extinguido en partes de su rango distribucional (ej. en Túnez, Brito et al., 2008). También figura en el Anexo II de la Convención de Berna y no figura en ningún anexo de la Directiva de Hábitats y Especies de la Unión Europea (Miras et al., 2006).

En España la especie no figura en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (CNEA, 2008), y, actualmente, está catalogada como NT "Casi Amenazada" en el "Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España" (Pleguezuelos et al., 2002). En Portugal, su estatuto de conservación ha pasado de "Datos Insuficientes" en el 2005 a "Vulnerable" en el 2008 (Oliveira et al., 2005a; Brito, 2008a). De hecho, recientes estudios sobre el estado de conservación de la víbora hocicuda (Santos et al., 2006) y de los ofidios ibéricos en general (Santos et al., 2007), han señalado a esta especie como muy vulnerable a la destrucción y fragmentación del hábitat debido a sus rasgos ecológicos muy especializados, identificándola como el ofidio ibérico con mayor riesgo de extinción.

Amenazas

Los principales factores de amenaza a las poblaciones y hábitats de *V. latastei* son:

- i) la alteración, fragmentación y destrucción del hábitat, que lleva a la disminución de la calidad y/o en la fragmentación de sus áreas de distribución originales, y en consecuencia, disminución de efectivos y correlativa pérdida de variabilidad genética, constituye su principal factor de amenaza (Madsen et al., 1996; Jaggi et al., 2000; Ujvári et al., 2002; Santos et al., 2006, 2007; Brito, 2008a). Se incluyen aquí alteraciones como (Galán, 1999; Brito & Crespo, 2002; Brito, 2003b):
 - a) los incendios forestales, uno de los principales factores de regresión de *V. latastei* en la zona mediterránea (ej. Cataluña; Parellada, 1995a),
 - b) el aprovechamiento de los suelos para la agricultura,
 - c) la silvicultura intensiva, las repoblaciones forestales con especies exóticas y la destrucción de bosques ripícolas, que afectan a toda la cadena trófica y conlleva una menor penetración de la radiación solar, impidiendo o dificultando la termorregulación (Langton & Burton, 1997);
 - d) el desarrollo urbanístico y carreteras, que reducen y fragmentan las poblaciones, así como, provocan el aumento de la depredación debida a especies domésticas, como perros y gatos (Langton & Burton, 1997);
- ii) atropellos en las carreteras, debido a la forma de su cuerpo y a su tipo de vida, las serpientes en general y las víboras en particular son muy vulnerables a los atropellos (ej. Brito & Alvares, 2004);

iii) persecución por aversión o por ser considerada una especie dañina (Whitaker & Shine, 2000).

En España fue extinta, en apenas tres años, la única población insular (Islas Columbretes) conocida de *Vipera latastei* (Bernis, 1968): entre 1856 y 1859, durante la construcción de un faro, se mataron más de 70 víboras por día, estimándose que, hasta la finalización de las obras, se llegó a más de 2.700 víboras;

iv) comercio ilegal para coleccionismo y por superstición. En Portugal, *Vipera latastei* es capturada y comercializada por motivos supersticiosos (Brito et al., 2001; Malkamus & Loureiro, 2007).

Víbora de Seoane - *Vipera seoanei* Lataste, 1879

Figura 7. Varios ejemplares de *V. seoanei seoanei*: macho adulto melánico de las sierra de Castro Laboreiro (Portugal) (A), hembra adulta del noroeste de la provincia de Burgos con diseño “Clásico” (B), juveniles del sur de la provincia de Santander con diseño casi “Uniforme” (E) y con diseño “Clásico” (G), macho adulto del norte de la provincia de Pontevedra con diseño “Clásico” (F), detalle lateral (C) y dorsal (D) de la cabeza del juvenil de la foto G.

Identificación

Se trata de una víbora de talla pequeña o mediana en comparación con el resto de víboras europeas. La cabeza es grande y bien diferenciada del cuerpo, con un hocico aplastado o ligeramente levantado (Fig. 1 y 7). Su cola es pequeña y representa entre el 10-15% de la longitud total del animal (Lataste, 1879; Saint-Girons & Duguy, 1976).

Los adultos pueden alcanzar los 750 mm de longitud total, pero normalmente varían entorno a los 450 mm (Braña, 1997b). La talla total máxima es de 585 mm para un macho de 12-13 años y 660 mm para una hembra de 11 años, ambos provenientes de Asturias (Braña, 1997b); en Galicia la longitud máxima registrada ha sido 590 mm para un macho (Galán & Fernández-Arias, 1993) y en Portugal ha sido de 500 mm también para un macho (Brito & Álvares, 2004).

Folidosis

Presenta dos escamas apicales (raramente una o tres), dos escamas cantales, tres o cuatro escamas loreales, de ocho a 10 escamas supralabiales (normalmente nueve), de nueve a 13 escamas infralabiales (normalmente de 10 a 12), y de seis a 12 escamas perioculares (normalmente de nueve a 10) (Schwarz, 1936; Saint-Girons 1978a; Bea et al., 1984; Mallow et al., 2003; Brito & Saint-Girons, 2005). Cerca del 50% de los individuos analizados por Braña (1997b) tuvieron una fila de pequeñas escamas entre las escamas perioculares y supralabiales; pero individuos con dos filas son también comunes ya que el 40% tuvo dos filas incompletas y el 10% dos filas completas.

Las escamas dorsales carenadas están dispuestas en 21 filas en medio del cuerpo, pero raramente hay individuos con 19 (1.8% de los casos) o 23 filas (5.4% de los casos) (Saint-Girons & Duguy, 1976). El número de escamas ventrales varía entre 129 y 150, y el número de pares de escamas subcaudales varía entre 24 y 42 (Saint-Girons & Duguy, 1976; Braña, 1978; Bea et al., 1984).

Patrones de coloración

V. seoanei es una especie muy polimórfica con una variación individual y geográfica notable (Fig. 7) (Bea et al., 1984). Se pueden diferenciar cuatro patrones de coloración dorsal diferentes (Saint-Girons & Duguy, 1976; Billing, 1983; Braña & Bas, 1983; Bea et al., 1984; Saint-Girons et al., 1986; Mallow et al., 2003; Brito & Saint-Girons, 2005):

- i) el patrón “Clásico”, que es el más característico, presenta una coloración de fondo dorsal y lateral beige o gris claro. En la zona dorsal hay una banda longitudinal más oscura con marcas negras alternas u opuestas que, normalmente, llegan a formar una banda en zigzag bien desarrollada;
- ii) el patrón “Bilineata” presenta la banda longitudinal dorsal separada en dos bandas longitudinales dorsolaterales sobre un fondo frecuentemente negro y uniforme;
- iii) el patrón “Cantábrica” se caracteriza por una reducción o total ausencia de la banda longitudinal. El zigzag dorsal es más estrecho y puede estar interrumpido formando bandas negras transversales sobre un fondo gris;
- iv) el patrón “Uniforme” se caracteriza por una coloración de fondo gris oscura homogénea sin marcas oscuras en el lado dorsal. Los individuos melánicos son más frecuentes en las áreas de montaña, representando 31% de las poblaciones de la cordillera Cantábrica y de la Sierra de la Cabrera y cerca del 85% de las poblaciones portuguesas de las sierras de Soajo y Peneda (Braña & Bas, 1983; Bea et al., 1984; Saint-Girons et al., 1986; Brito, 2004b).

Variación geográfica

Descrita inicialmente como *Vipera berus seoanei* por Lataste en 1879, las marcadas diferencias en la morfología externa permitieron su elevación al nivel específico (Duguy & Saint-Girons, 1976; Saint-Girons & Duguy, 1976). En la actualidad se reconocen dos subespecies, separadas por áreas de introgresión secundaria (Fig. 8), donde individuos morfológicamente distintos e intermedios pueden ser hallados juntos (Bea et al., 1984):

- i) *Vipera seoanei seoanei* Lataste, 1879. Se caracteriza por un reducido número de escamas ventrales (machos: 137.3 ± 3.0 ; hembras: 137.9 ± 3.3). Es muy polimórfica, con importantes variaciones en el patrón de coloración (incluye los patrones “Clásico”, “Uniforme”, “Bilineata” y melánico), en el nivel de fragmentación de las escamas cefálicas y en la toxicidad del veneno. En las poblaciones del País Vasco, Cantabria y áreas costeras y centrales de Asturias, las escamas cefálicas están poco fragmentadas (16.67 ± 4.01 escamas intercantales + intersupraoculares), los individuos tienen frecuentemente el patrón de coloración “Clásico”, y el veneno es menos tóxico (Bea et al., 1984; Saint-Girons et al., 1986; Detrait et al., 1990). En las poblaciones de Galicia las escamas cefálicas están más fragmentadas (22.34 ± 5.72 escamas intercantales y intersupraoculares) y el patrón de coloración “Clásico” es menos frecuente (Braña & Bas, 1983; Bea et al., 1984). En los Picos de Europa hay una elevada proporción de individuos con los patrones de coloración “Bilineata” y “Uniforme”, con la toxicidad del veneno intermedia con la subespecie *V. seoanei cantabrica* (Bea et al., 1984; Detrait et al., 1990);
- ii) *Vipera seoanei cantabrica* Braña & Bas, 1983. Esta subespecie presenta un mayor número de escamas ventrales (machos: 141.7 ± 3.0 ; hembras: 143.9 ± 3.5), las escamas cefálicas muy fragmentadas (24.5 ± 6.65 escamas intercantales + intersupraoculares), el patrón de coloración característico de tipo “Cantábrico” y el veneno presenta niveles elevados de toxicidad. Se encuentra en el norte de León, en el área sudoeste de los Picos de Europa, y en las montañas de Galicia oriental y sudoeste de Asturias (Fig. 19) (Braña & Bas, 1983; Bea et al., 1984; Detrait et al., 1990; Balado et al., 1995).

Además, se ha descrito convergencia morfológica –en cuanto a la elevación del hocico y el patrón dorsal– con *V. aspis* en los Pirineos Atlánticos (Duguy et al., 1979; Bea et al., 1985b).

Distribución

Se trata de casi un endemismo Ibérico, ya que está presente en el noroeste de Portugal (en tres poblaciones aisladas en las montañas de Paredes de Coura, Castro Laboreiro/Soajo y Tourém/Montalegre/Larouco), norte de España (en casi toda Galicia, Asturias, Cantabria, País Vasco, áre-

as de montaña de clima Atlántico del norte de León, Palencia, Burgos, Álava y Navarra, y también en el extremo occidental de Zamora) y penetra unos pocos kilómetros en el extremo suroeste de Francia (Fig. 8) (Crespo & Sampaio, 1994; Braña, 1997b; Braña & Bea 1997; Godinho et al. 1999; Ferrand de Almeida et al. 2001; Braña, 2002; Brito & Crespo, 2002; Brito, 2008b).

Se encuentra desde el nivel del mar hasta los 1.900 m de altitud en la cordillera Cantábrica, aunque es más frecuente por debajo de los 1.500 m debido a la calidad de los hábitats (Braña, 2002).

Figura 8. Área de distribución de *Vipera seoanei*, con las zonas que ocupa cada subespecie. Adaptado de Ple-guezuelos et al. 2002 y Brito 2008b.

Hábitat

El hábitat característico de *V. seoanei* en toda su área de distribución son las masas forestales abiertas húmedas (*Quercus robur* y *Q. pyrenaica*), zonas de ecotono entre prados y bosques, y áreas con abundante vegetación basal (*Erica sp.*, *Daboecia cantabrica*, *Pteridium sp.* y *Ulex sp.*), que permitan la termorregulación (Saint-Girons & Duguy, 1976; Braña, 1978, 2002; Bea, 1985; Galán, 1988; Balado et al., 1995; Brito & Crespo, 2002; Mallow et al., 2003). De 105 observaciones de *V. seoanei* de Galicia, un 34% fueron en matorrales de *Erica sp.* y *Ulex sp.*, un 18% en matorral de lindes entre fincas, un 13% en prados y cultivos, un 10% en áreas rupícolas, un 5% en bosques de hoja caduca y un 3% en áreas rocosas y arenales costeros (Galán, 1988). En el País Vasco francés ocupa sustratos de hojas y helechos secos en la primavera, mientras en verano frecuentemente ocupa praderas húmedas, apareciendo más raramente en sustratos rocosos desnudos (Saint-Girons & Duguy, 1976). No hay registros de actividad arbórea, pero el 7% de las observaciones en

Galicia eran de ejemplares localizados a 1/2 – 1 metro del suelo, normalmente sobre praderas húmedas y turberas (Galán, 1988). Aparece menos frecuentemente en áreas rocosas que las otras víboras europeas (Saint-Girons, 1975), y utiliza las rocas para refugio menos frecuentemente que las otras especies de serpientes (Galán, 1988).

Actividad

El periodo de actividad anual se extiende desde marzo hasta octubre, con actividad continua entre Abril y Septiembre (Braña et al., 1988; Galán, 1988). La actividad invernal es rara, apenas 3% de 105 observaciones en Galicia ocurrieron entre noviembre y febrero (Galán, 1988). Sin embargo, los machos adultos pueden ser hallados activos durante los últimos días de invierno, pues terminan la hibernación antes que las hembras (Saint-Girons & Duguy, 1976). Se trata de una especie diurna, pero en verano la actividad es bimodal con un período de inactividad durante las horas centrales del día (Galán, 1988). La actividad nocturna es común durante los días más cálidos del verano (Saint-Girons, 1975; Galán, 1988).

Los ciclos de mudas son regulares, pero se diferencian de acuerdo con el sexo, edad y estado reproductor de las víboras (Saint-Girons & Duguy, 1976; Saint-Girons, 1980b). Los machos adultos mudan la piel dos veces al año, la primera muda es post nupcial y ocurre a finales de mayo o inicio de junio, mientras la segunda ocurre en agosto. Las hembras adultas también mudan la piel dos veces al año, las hembras reproductoras a finales de junio y finales de agosto, y las hembras no reproductoras a inicios de junio y finales de julio. Algunas hembras no-reproductoras y los juveniles mudan la piel tres veces al año, a inicios de mayo, finales de junio e inicio de agosto (Saint-Girons, 1980b).

Reproducción

Contrariamente a otras especies del clado *pelias*, los machos tienen un ciclo espermatogénico de tipo “mixto” (Saint-Girons, 1976, 1982, 1992; Saint-Girons & Duguy, 1976; Schuett, 1992; Braña, 1997b; Nilson & Andrén, 1997; Mallow et al., 2003), es decir, la espermatogénesis se inicia en el verano, se detiene durante la hibernación y se completa en la primavera del año siguiente. Hay espermatozoides en los vasos deferentes durante todo el año, pero su número aumenta entre octubre y abril (Saint-Girons & Duguy, 1976). Los apareamientos tienen lugar en primavera, desde finales de marzo hasta inicios de mayo. Hay registros de actividad sexual por parte de los machos en otoño, pero no hay observaciones de cópulas en este período (Saint-Girons & Duguy, 1976; Balado et al., 1995; Braña, 1997b).

Las hembras tienen un ciclo vitelogénico postnupcial (Saint-Girons, 1992), en el que el desarrollo de los folículos se inicia entre el final del verano y el inicio de la hibernación, y se completa en la primavera del año siguiente cuando alcanzan la talla adecuada para la ovulación. La fecha de ovulación es constante cada año, ocurriendo desde finales de mayo hasta inicios de junio. Los partos tienen lugar desde mediados de agosto hasta finales de octubre, dependiendo de las condiciones climáticas (Saint-Girons & Duguy, 1976; Braña, 1978).

En Asturias, el número de crías por parto varía entre tres y 10 (media de 5.95) y está correlacionado con la talla y edad de las hembras (Braña, 1978). En siete hembras capturadas en el País Vasco, la fecundidad varió entre tres y ocho viboreznos (media de cinco), que pesaban entre 4.1 y 6.0 g (media de 5.1 g) (Saint-Girons & Duguy, 1976). La longitud total de los recién nacidos es 190 mm de media, y el peso medio de una camada es 35.0 g de media, representando cerca del 50.7% del peso de la hembra (Saint-Girons & Naulleau, 1981).

La proporción de hembras que no se reproduce en cada año aumenta con la latitud y/o altitud, siendo el ciclo reproductor bianual lo más común en estas regiones (Saint-Girons & Duguy, 1976; Braña, 1978). Sin embargo, en años con condiciones climáticas muy favorables, los partos pueden ser anticipados, permitiendo a las hembras adquirir una buena condición corporal antes de la hibernación, y subsecuentemente reproducirse en el año siguiente (Saint-Girons, 1979).

Ecología trófica

V. seoanei es un predador diurno, de estrategia al acecho y que rara vez busca activamente las presas. Las presas más comunes en la dieta son los micromamíferos, principalmente roedores, pero también insectívoros. Otras presas incluyen los reptiles, generalmente los lacértidos *Podarcis* y *Lacerta*, pero también *Anguis fragilis*, los anfibios, principalmente *Salamandra salamandra* y ocasionalmente *Rana*, y también renacuajos. Los invertebrados, como los artrópodos, sólo son consumidos marginalmente (Braña, 1978; Saint-Girons, 1983; Braña et al., 1988; Galán, 1988; Bea et al., 1992). Los micromamíferos representan 89% de la biomasa total ingerida (41% para los Microtinae, 22% para los Murinae y 10% para los Soricidae), mientras que anfibios, reptiles y aves representan una fracción marginal (3, 5 y 3%, respectivamente), tanto para víboras juveniles como adultas (Braña et al., 1988).

No hay diferencias sexuales en la composición de la dieta (Braña et al., 1988), sin embargo si existen diferencias con la edad (cambios ontogénicos en la composición de la dieta): las víboras juveniles consumen más frecuentemente anfibios y reptiles que los adultos (Braña, 1978; Saint-Girons, 1980c; Braña et al., 1988). Aunque los micromamíferos son la presa más habitual en la dieta de las víboras juveniles, éstos están representados principalmente por especies de pequeña

talla (insectívoros), mientras que las víboras adultas consumen más frecuentemente micromamíferos de mayor talla, como los Microtidae (Braña et al., 1988). De hecho, las víboras juveniles sólo empiezan a consumir mamíferos insectívoros cuando la talla total alcanza los 230-250 mm, durante el segundo año de vida (Saint-Girons, 1980c), y los mamíferos sólo son consumidos de inmediato cuando la talla es mayor de 350-400 mm de longitud corporal (Bea et al., 1992).

La actividad de alimentación varía durante el ciclo anual de acuerdo con el sexo, edad, estado reproductor y cambio de piel (Saint-Girons, 1979). El período de alimentación tiene lugar entre abril y septiembre. Los machos adultos empiezan a comer después de la reproducción, desde finales de abril o inicios de mayo, con el consumo máximo de presas entre junio y julio. La última alimentación ocurre a finales de agosto o principios de septiembre. Las hembras adultas empiezan a comer desde inicios de abril hasta finales de septiembre. Las hembras reproductoras presentan un consumo máximo de presas en mayo y junio, pero paran de comer a finales de julio. Las hembras no reproductoras consumen presas de una forma continua, pero presentan un consumo máximo de presas en junio y agosto (Saint-Girons & Duguy, 1976; Braña et al., 1988; Bea et al., 1992). Los machos adultos pueden consumir de tres a siete presas al año (media de cinco), las hembras reproductoras entre tres y seis presas (media de cuatro), y las hembras no reproductoras de tres a 13 presas al año (media de ocho) (Braña et al., 1988). La actividad trófica, medida como el porcentaje de individuos con presas en el estómago, muestra que las hembras no reproductoras consumen presas más frecuentemente (75%), seguidas por los machos adultos (64%), las víboras juveniles (51%) y las hembras reproductoras (34%) (Braña et al., 1988).

	región cantábrica (1)	Galicia (2)
Urodela	5.08	3.33
Anura	0.85	6.67
Anfibios indet.	3.39	-
Total de anfibios	9.32	10
Anguidae	5.08	3.33
Lacertidae	8.48	3.33
Total Reptiles	13.56	6.66
Aves	5.08	-
Soricidae	18.65	3.33
Cricetidae	32.2	53.36
Muridae	17.78	13.33
Mamíferos indet.	3.39	13.33
Total Mamíferos	72.02	83.35

Tabla 3. Frecuencia de los diferentes tipos de presa en la dieta de *V. latastei*. Referencias: (1) Braña et al. 1988, (2) Galán 1988.

Demografía

Estudios esqueleto-cronológicos muestran una fase de crecimiento rápida desde el nacimiento hasta la madurez sexual. Los recién nacidos varían entre 150 y 180 mm de longitud corporal al final del año de nacimiento, y alcanzan la madurez sexual con 320-380 mm, entre los cuatro y cinco años de edad. Después de la madurez sexual, la tasa de crecimiento disminuye, así, por ejemplo, víboras con ocho y 10 años miden 420 y 440 mm, respectivamente. La longevidad es de 13 años (Braña, 1978). El sex-ratio es 1:1 en neonatos y víboras juveniles, mientras que los machos adultos son más frecuentemente capturados que las hembras adultas (Braña, 1978).

Termorregulación

La temperatura cloacal durante las primeras horas de termorregulación matinal varía entre 24-27°C, pero puede subir hasta los 32°C, mientras que la temperatura corporal óptima es de 30°C (Saint-Girons, 1975; Saint-Girons & Duguy, 1976). La temperatura también es muy importante para la digestión: por debajo de los 15°C las presas son regurgitadas, a 15°C la digestión se completa en 15 días, a 20°C la digestión dura cinco días y por encima de los 25°C la digestión se completa en dos o tres días (Naulleau, 1982).

Dominio vital

No hay datos sobre dominios vitales en *V. seoanei*.

Estatus de conservación

V. seoanei figura como LC “Preocupación Menor” en la Lista Roja de las Especies Amenazadas de la UICN, debido a la persecución directa por el hombre, pérdida de hábitat por incendios y la intensificación de la agricultura, en particular la destrucción de bordes de pastos (Pleguezuelos et al., 2006). También figura en el Anexo III de la Convención de Berna y no aparece en ningún anexo de la Directiva de Hábitats y Especies de la Unión Europea (Pleguezuelos et al., 2006).

En España la especie no se contempla en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (CNEA, 2008), y, actualmente, está catalogada como LC “Preocupación menor” en el “Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España” puesto que su estado de conservación se considera aceptable o bueno en la mayor parte del área de distribución de la especie (Pleguezuelos et al., 2002). En Portugal está considerada “En Peligro” debido a la escasa área de distribución que presenta en el país, al alto nivel de fragmentación existente entre sus poblaciones y al declive continuo en la calidad de sus hábitats (Braña, 2002; Oliveira et al., 2005b; Brito, 2008b).

Amenazas

El principal factor de amenaza es la destrucción de los hábitats debida a la intensificación de la agricultura, con la destrucción de márgenes de bosques y muros de piedra, la plantación extensiva de *Pinus* y *Eucalyptus*, y el incendio continuo de matorrales (Barbadillo et al., 1999; Galán, 1999).

Las poblaciones más meridionales están aisladas y localizadas en pequeñas áreas de hábitat adecuado (Bea, 1985; Braña, 1997b; Brito, 2004b; Brito, 2008b), en algunos casos debido a destrucción de los hábitats por la progresiva mecanización de la agricultura y el aumento de las áreas agrícolas extensivas (Bea, 1985; Braña, 2002).

En Francia, las poblaciones están aisladas y algunas se extinguirán debido a la destrucción de los hábitats para urbanizaciones en las áreas al sur de Saint-Jean-Luz (Saint-Girons, 1989).

También cabe destacar la persecución directa y los atropellos en carreteras, puesto que son factores de amenaza adicionales para esta especie (Barbadillo et al., 1999; Galán, 1999; Brito & Álvarez, 2004; Brito, 2008b).

Referencias

- Balado, R., Bas, S., Galán, P. (1995). Anfibios e réptiles. Pp. 65-170. En: Consello da Cultura Galega y Sociedade Galega de Historia Natural (Eds.). *Atlas de Vertebrados de Galicia. Tomo 1º: Peixes, Anfíbios, Réptiles e Mamíferos*. Agencia Gráfica, S.A. Santiago de Compostela.
- Barbadillo, L.J. (1987). *La Guía de Incafo de los Anfibios y Reptiles de la Península Ibérica, islas Baleares y Canarias*. Incafo. Madrid.
- 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*. GeoPlaneta, Barcelona.
- Barbanera, F., Zuffi, M.A.L., Guerrini, A., Tofanelli, S., Fasola, M., Dini, F. (2009). Molecular phylogeography of the asp viper *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) in Italy: Evidence for introgressive hybridization and mitochondrial DNA capture. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**: 103-114.
- Bea, A. (1985a). Atlas de los Anfibios y Reptiles de Álava, Vizcaya y Guipúzcoa. Pp. 57-99. En: Álvarez, J., Bea, A., Faus, J.-M., Castián, E., & Mendiola, I. (Eds.). *Atlas de los vertebrados continentales de Álava, Vizcaya y Guipúzcoa*. Departamento de Política Territorial y Transportes del Gobierno Vasco. Bilbao.
- Bea, A. (1985b). La repartición de las víboras *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) y *Vipera seoanei* (Lataste, 1879) en el País Vasco. *Cuadernos de sección, Ciencias Naturales, Eusko Ikaskunz* **2**: 7-20.
- Bea, A. (1997). *Vipera aspis*. Pp. 469-480. En: Salvador, A. (Coord.). *Fauna Ibérica. Vol. 10. Reptiles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid.
- Bea, A., Bas, S., Braña, F., Saint-Girons, H. (1984). Morphologie comparée et répartition de *Vipera seoanei* Lataste 1879, en Espagne. *Amphibia-Reptilia* **5**: 395-410.
- Bea, A., Braña, F. (1988). Nota sobre la alimentación de *Vipera latastei* Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae). *Munibe* **40**: 121-124.
- Bea, A., Braña, F. (1997). *Vipera latastei*. Pp. 480-488. En: Salvador, A. (Coord.). *Fauna Ibérica. Volumen 10. Reptiles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Bea, A., Braña, F., Baron, J.P., Saint-Girons, H. (1992). Régimes et cycles alimentaires des vipères européennes (Reptilia, Viperidae). *Année Biologique* **31**: 25-44.
- Bergerandi, A. (1981). Estudio herpetológico de Navarra (biometría, distribución y biología de la herpetofauna navarra). *Príncipe de Viana (Suplemento de Ciencias)* **1**: 105-124.
- Bernis, F. (1968). La culebra de las islas Columbretes: *Vipera latastei*. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Biol.)* **66**: 115-133.
- Billing, H. (1983). Polymorphismus bei *Vipera berus seoanei*. *Herpetofauna* **24**: 31-33.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Mauget, R. (1992). Cycle sexual de la femelle de *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae): importance des réserves et aspects métaboliques. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **117**: 279-290.

- Bonnet, X., Naulleau, G., Mauget, R. (1994). The influence of body condition on 17- β estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). *Génétique Comparée et Endocrinologie* **93**: 424-437.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Lourdais, O., Vacher-Vallas, M. (1999). Growth in the asp viper (*Vipera aspis* L.): insights from long term field study. Pp. 63-69. En: Miaud, C., Guyétant, R. (Eds.). *Current Studies in Herpetology*. Societas Europaea Herpetologica, Le Bourget du Lac.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Bradshaw, D., Shine, R. (2001a). Changes in plasma progesterone in relation to vitellogenesis and gestation in the viviparous snake, *Vipera aspis*. *General and Comparative Endocrinology* **121**: 84-94.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R., Lourdais, O. (2001b). Short-term versus long-term effects of food intake on reproductive output in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Oikos* **92**:297-308.
- Bons, J., Geniez, P. (1996). *Anfibios y Reptiles de Marruecos (Incluido Sáhara Occidental)*. Atlas Biogeográfico. Asociación Herpetológica Española, Barcelona.
- Bons, J., Saint-Girons, H. (1982). Le cycle sexuel des reptiles males au Maroc et ses rapports avec la répartition géographique et le climat. *Bulletin Société Zoologique de France* **107**: 71-86.
- Boscá, E. (1879). Las víboras de España. *Anales Sociedad Española de Historia Natural* **8**: 65-86.
- Braña, F. (1978). Algunos datos sobre morfología y biología de *Vipera seoanei* Lataste 1878 en Asturias. *Boletín del Instituto de Estudios Asturianos* **23**: 143-153.
- Braña, F. (1997a). Familia Viperidae. Pp. 466-469. En: Salvador, A. (Coord.). *Fauna Ibérica. Vol. 10. Reptiles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Braña, F. (1997b). *Vipera seoanei*. Pp. 489-497. En: Salvador, A. (Coord.). *Fauna Ibérica. Vol. 10. Reptiles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Braña, F. (2002). *Vipera seoanei*. Pp. 301-302. En: 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 e Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- Braña, F., Bas, S. (1983). *Vipera seoanei cantabrica* ssp. n. *Munibe* **35**: 87-88.
- Braña, F., Bea, A. (1997). *Vipera seoanei*. Pp. 291-293. En: Pleguezuelos, J.M. (Ed.). *Distribución y Biogeografía De Los Anfibios y Reptiles En España y Portugal*. Asociación Herpetológica Española, Granada.
- Braña, F., Bea, A., Saint-Girons, H. (1988). Composición de la dieta y ciclos de alimentación en *Vipera seoanei* Lataste, 1879. Variaciones en relación con la edad y el ciclo reproductor. *Munibe* **40**: 19-27.
- Brito, J.C. (2001). A record of melanism in *Vipera latasti*. *Herpetological Bulletin* **76**: 28-29.
- Brito, J.C. (2003a). Seasonal variation in movements, home range and habitat use by male *Vipera latastei* in northern Portugal. *Journal of Herpetology* **37**: 155-160.
- Brito, J.C. (2003b). Seasonal and daily activity patterns of *Vipera latastei* in northern Portugal. *Amphibia-Reptilia* **24**: 497-508.

- Brito, J. C. (2004a). Feeding ecology of *Vipera latastei* in Northern Portugal: ontogenetic shifts, prey size and seasonal variations. *Herpetological Journal* **14**: 13-19.
- Brito, J.C. (2004b). Víbora hocicuda - *Vipera latastei*. En: Carrascal, L. M., Salvador, A. (Eds.). Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Brito, J.C. (2008a). *Vipera latastei*. Pp. 182-183. En: 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 Biodiversidade, Lisboa.
- Brito, J.C. (2008b). *Vipera seoanei*. Pp. 184-185. En: 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 Biodiversidade, Lisboa.
- Brito, J. C., Álvares, F. J. (2004). Patterns of road mortality in *Vipera latastei* and *V. seoanei* from northern Portugal. *Amphibia-Reptilia* **25**: 459-465.
- Brito, J.C., Crespo, E.G. (2002). Distributional analysis of two vipers (*Vipera latastei* and *V. seoanei*) in a potential area of sympatry in the Northwestern Iberian Peninsula. Pp. 129-138. En: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.). *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing. Utah.
- Brito, J.C., Feriche, M., Herrera, T., Kaliontzopoulou, A., Martínez-Freiría, F., Nesbitt, D., Omolo, D., Ontiveros, D., Quiñoz, L., Pleguezuelos, J.M., Santos, X., Sillero, N. (2008). En los límites de su distribución: anfibios y reptiles paleárticos en el noroeste de Túnez. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* **19**: 75-82.
- Brito, J.C., Rebelo, R. (2003). Differential growth and mortality affect sexual size dimorphism in *Vipera latastei*. *Copeia*, 2003: 865-871.
- Brito, J.C., Rebelo, A., Crespo, E.G. (2001). Viper killings for superstitious reasons in Portugal. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* **12**: 101-104.
- Brito, J. C. & Saint-Girons, H. (2005). *Vipera (Pelias) seoanei* Lataste, 1879 – Seoanes Viper, Spanische Viper, Spanische Kreuzotter. Pp. 355-374. En: Joger, U., Stümpel, N. (Eds.). *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIB. Schlangen (Serpentes). III. Viperidae*. Aula Verlag, Wiebelsheim.
- Brito, J.C., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Fahd, S., Llorente, G.A., Parellada, X. (2006). Morphological variability of the Lataste's viper (*Vipera latastei*) and the Atlas dwarf viper (*Vipera monticola*): patterns of biogeographical distribution and taxonomy. *Amphibia-Reptilia* **27**: 219-240.
- Brito, J.C., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Sillero, N. (2008a). Inferring evolutionary scenarios with geostatistics and Geographical Information Systems (GIS) for the viperid snakes *Vipera latastei* and *V. monticola*. *Biological Journal of the Linnean Society* **95**: 790–806.
- Brito, J.C., Feriche, M., Herrera, T., Kaliontzopoulou, A., Martínez-Freiría, F., Nesbitt, D., Omolo, D., Ontiveros, D., Quiñoz, L., Pleguezuelos, J.M., Santos, X., Sillero, N. (2008b). En los límites de su distribución: anfibios y reptiles paleárticos en el noroeste de Túnez. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* **19**: 75-82.

- Bruno, S. (1976). L'ornamentazione della *Vipera aspis* (L., 1758) in Italia. *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano* **117**: 165-194.
- Bruno, S. (1985). *Le vipere d'Italia e d'Europa*. Edagricole. Bologna.
- Capula, M., Luiselli, L. (1990). Contributo allo studio della microteriofauna di un'area dell'Italia centrale (monti delle Tolfa, Lazio) mediante analisi del contenuto stomacale di *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). *Hystrix* **2**: 101-107.
- Castanet, J. (1974). Etude histologique des marques squelettiques de croissance chez *Vipera aspis* (L.) (Ophidia, Viperidae). *Zoologica Scripta*, **3**: 137-151.
- Castanet, J., Naulleau, G. (1974). Données expérimentales sur la valeur des marques squelettiques comme indicateur de l'âge chez *Vipera aspis* (L.) (Ophidia, Viperidae). *Zoologica Scripta* **3**: 201-208.
- Castanet, J., Naulleau, G. (1982). La squeletteochronologie chez les Reptiles. II. Résultats expérimentaux sur la signification des marques de croissance squelettiques chez les serpents. Remarques sur la croissance et la longévité de la Vipère Aspic. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie*, 13ème Série **7**: 41-62.
- CNEA (2008). *Catálogo Nacional de Especies Amenazadas, Vertebrados, Reptiles*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España. http://www.mma.es/portal/secciones/biodiversidad/especies_amenazadas/catalogo_especies/vertebrados_reptiles/index.htm
- Corti, C., Nistri, A., Poggesi, M., Vanni, S., (1991). Biogeographical analysis of the Tuscan herpetofauna (Central Italy). *Revista Española de Herpetología*. **5**: 51-75.
- Corti, C., Pleguezuelos, J., Pérez-Mellado, V., Marquez, R., Cheylan, M., Geniez, P., Joger, U., Nettmann, H.K., Schmidt, B., Meyer, A. (2006). *Vipera aspis*. En: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>.
- Crespo, E.G. (1973). Sobre a distribuição e ecologia da herpetofauna portuguesa. *Arquivos do Museu Bocage* **4**: 247-260.
- Crespo, E.G., Oliveira, M.E. (1989). *Atlas da Distribuição dos Anfíbios e Répteis de Portugal Continental*. S.N.P.R.C.N., Lisboa.
- Crespo, E.G., Sampaio, L. (1994). *As Serpentes de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.
- Detrait, J., Bea, A., Saint-Girons, H., Choumet, V. (1990). Les variations géographiques du venin de *Vipera seoanei* Lataste (1879). *Bulletin de la Société Zoologique de France* **115**: 277-285.
- Duguy, R. (1958). Le comportement de printemps chez *Vipera aspis*. *Vie et Milieu* **9**(2): 200-210.
- Duguy, R. (1963). Biologie de la latence hivernale chez *Vipera aspis* L. *Vie et Milieu* **14**(2): 311-443.
- Duguy, R. (1972). Notes sur la biologie de *Vipera aspis* L. dans les Pyrénées. *La Terre et la Vie* **1**:98-117.
- Duguy, R., Martínez-Rica, J. P., Saint-Girons, H. (1979). La répartition des vipères dans les Pyrénées et les régions voisines du nord de l'Espagne. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* **115**: 359-377.
- Duguy, R., Saint-Girons, H. (1970). Etude morphologique des populations de *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) dans l'ouest de la France. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris*, 2^a sér., **41**: 1069-1090.

- Duguy, R., Saint-Girons, H. (1976). Le statut de *Vipera seoanei* Lataste, 1879. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **101**: 729-730.
- Escala, M.C., Jordana, R. (1982). *Fauna de Navarra. Anfibios y Reptiles*. Ediciones y Libros, S.A. Pamplona.
- Escala, M.C., Pérez-Mendía, J.L. (1979). Contribución al estudio herpetológico de Navarra. *Munibe* **31**: 165-170.
- Escarré, J., Vericad, J. R. (1981). Fauna Alicantina. I. - Saurios y Ofidios. *Cuadernos de la Fauna Alicantina* **15**: 1-101.
- Fahd, S., Pleguezuelos, J. M. (2001). Los reptiles del Rif (Norte de Marruecos), II: anfisbenios y ofidios. Comentarios sobre la biogeografía del grupo. *Revista Española de Herpetología* **15**: 13-36.
- Falcón, J. M., Clavel, F. (1987). Nuevas citas de anfibios y reptiles en Aragón. *Revista Española de Herpetología* **2**: 83-130.
- Ferrand de Almeida, N., Ferrand de Almeida, P., Gonçalves, H., Sequeira, F., Teixeira, J., Ferrand de Almeida, F. (2001). *Anfibios e Répteis de Portugal*. FAPAS. Câmara Municipal do Porto. Porto.
- Ferrand de Almeida, N., Ferrand de Almeida, P., Gonçalves, H., Sequeira, F., Teixeira, J., Ferrand de Almeida, F. (2001). *Anfibios e Répteis de Portugal*. FAPAS. Câmara Municipal do Porto. Porto.
- Galán, P. (1983). Las víboras de la Península Ibérica. *Quercus* **8**: 17-19.
- Galán, P. (1988). Segregación ecológica en una comunidad de ofidios. *Doñana Acta Vertebrata* **15**: 59-78.
- Galán, P. (1999). *Conservación de la herpetofauna gallega. Situación actual de los anfibios y reptiles de Galicia*. Universidade da Coruña. Servicio de Publicacións. Monografía Nº 72. A Coruña.
- Galán, P., Fernández-Arias, G. (1993). *Anfibios e Réptiles de Galicia*. Edicións Xerais, Vigo.
- Garrigues, T., Dauga, C., Ferquel, E., Choumet, V., Failloux, A.-B. (2005). Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**: 35-47.
- Gasc, J.-P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., 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. (1997). *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*. Societas Europaea Herpetologica and Museum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Godinho, M.R.B., Teixeira, J., Rebelo, R., Segurado, P., Loureiro, A., Álvares, F., Gomes, N., Cardoso, P., Camilo-Alves, C., Brito, J.C. 1999. Atlas of the continental Portuguese herpetofauna: an assemblage of published and new data. *Revista Española de Herpetología* **13**: 61-82.
- Golay, P., Monney, J.-C., Conelli, A., Durand, T., Thiery, G., Zuffi, M.A.L., Ursenbacher, S. (2008). Systematics of the Swiss asp vipers: some implications for the European *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) complex (Serpentes: Viperidae) – A tribute to Eugen Kramer. *Amphibia-Reptilia* **29**: 71-83.

- Golay, P., Smith, H.M., Broadley, D.G., Dixon, J.R., McCarthy, C., Rage, J.C., Schatti, B., Toriba, M. (1993). *Endoglyphs and other major venomous snakes of the world. A checklist*. Azemiops S. A. Geneva, Switzerland.
- González, D. (1977). Notas sobre distribución, morfología y biometría de Viperidae (Reptilia, Ophidia). *Miscelània Zoològica, Barcelona* **4**: 241-263.
- Gosá, A. (1997). *Vipera aspis*. Pp. 285- 287. En: Pleguezuelos, J.M. *Distribución y Biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*. Monografías Tierra del Sur. Universidad de Granada. Asociación Herpetológica Española.
- Gosá, A. (2002). *Vipera aspis*. Pp. 295-297. En: 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 – Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- Jaggi, C., Baur, B. (1999). Overgrowing forest as a possible cause for the local extinction of *Vipera aspis* in the northern Swiss Jura mountains. *Amphibia-Reptilia* **20**: 25-34.
- Jaggi, C., Wirth, T., Baur, B. (2000). Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for a conservation strategy. *Biological Conservation* **94**: 69-77.
- Kramer, E. (1958). Eine neue Rasse der Aspispiper aus dem süddwestlichen Frankreich, *Vipera aspis zinnikeri* n. subsp. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zurich* **103**: 321-326.
- Kreiner, G. (2007). *The Snakes of Europe. All species from West of the Caucasus Mountains*. Frankfurt am Main. Edition Chimaira. Germany.
- Langton, T., Burton, J.A. (1997). *Amphibians and Reptiles - Conservation Management of Species and Habitats*. Council of Europe Publishing.
- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., Joger, U. (2001). Evolutionary Relationships among the True Vipers Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**: 94-104.
- López Jurado, L. F., Caballero, M. R. (1981). Predación de *Vipera latastei* sobre *Mustela nivalis*. *Doñana Acta Vertebrata* **8**: 298-299.
- Lourdais, O., Bonnet, X., Shine, R., DeNardo, D., Naulleau, G., Guillon, M. (2002). Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment: a longitudinal study of a viviparous snake. *Journal of Animal Ecology* **71**: 470-479.
- Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Naulleau, G., Guillon, M. (2004). Climate affects offspring phenotypes in a viviparous snake. *Oikos* **104**:551-560.
- Luiselli, L.M., Agrimi, U. (1991). Composition and variation of the diet of *Vipera aspis francisciredi* in relation to age and reproductive stage. *Amphibia-Reptilia* **12**: 137-144.
- Luiselli, L.M., Filippi, E. (2006). Null models, co-occurrence patterns, and ecological modeling of a Mediterranean community of snakes. *Amphibia-Reptilia* **27**: 325-337.
- Luiselli, L., Rugiero, L. (1990). On habitat selection and phenology in six species of snakes in Canale Monterano (Tolfa Mountains, Latium, Italy) including data on reproduction and feeding in *Vipera aspis francisciredi* (Squamata: Viperidae). *Herpetozoa* **2**: 107-115.

- Madsen, T., Shine, R., Loman, J., Håkansson, T. (1993). Determinants of mating success in male adders, *Vipera berus*. *Animal Behaviour* **45**: 491-499.
- Madsen, T., Stille, B., Shine, R. (1996). Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* **75**: 113-118.
- Malkmus, R. (1995). *Amphibien und reptilien Portugal, Madeiras und der Azoren*. Die Neue Brehm Bücherei, 621. Westarp Wiss. Magdeburg.
- Malkamus, R., Loureiro, A. (2007). Cabeças de víbora – Köpfe von *Vipera latastei* als Handelsgut in Portugal. *Zeitschrift für Feldherpetologie* **14**: 77-86.
- Mallow, D., Ludwig, D., Nilson, G. (2003). *True Vipers. Natural History and Toxinology of Old World Vipers*. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida.
- Maluquer, J. (1917). Les serps de Catalunya. *Treballs del Museum Barciononensis Scientarum Opera, Serie Zoologica* **7**: 1-87.
- Martínez-Rica, J.P. (1983). Atlas herpetológico del Pirineo. *Munibe* **35**: 51-80.
- Mc Diarmid, R. W., Campbell, J. A., Touré, T. A. 1999. *Snake species of the world. A taxonomic and geographic reference*. The Herpetologist' League, Washington DC.
- Mertens, R., Muller, L. (1928). Liste der amphibian und reptilian Europas. *Abhandlungen Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* **41**: 1-62.
- Miras, J.A.M., Cheylan, M., Nouria, M.S., Joger, U., Sá-Sousa, P., Pérez-Mellado, V. (2006). *Vipera latastei*. En: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 15 December 2008.
- Monney, J.-C. (1990a). Comparaison des cycles annuels d'activité de *Vipera aspis* et *Vipera berus* (Ophidia, Viperidae) dans une station des préalpes bernoises (Ouest de la Suisse). *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **71-72**: 49-61.
- Monney, J.-C. (1990b). Régime alimentaire de *Vipera aspis* L. (Ophidia, Viperidae) dans les préalpes bernoises (Ouest de la Suisse). *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **53**: 40-49.
- Monney, J.-C. (1992). Note sur l'utilisation de l'habitat et les déplacements chez la Vipère aspic, *Vipera aspis* L., dans une station de l'Intyamon. *Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles* **81**: 28-40.
- Monney, J.-C. (1993). Predation of lizards and frogs by adult vipers, *Vipera aspis*, in the Bernese Prealpine region (West Switzerland). *Amphibia-Reptilia* **14**: 93-95.
- Monney, J.-C. (1996). Biologie comparée de *Vipera aspis* L. et de *Vipera berus* L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes Bernoises. PhD Thesis. Institute of Zoology, Faculty of Sciences, University of Neuchatel, Neuchatel, Switzerland.
- Monney, J.-C., Meyer, A. (2005). *Rote Liste der gefährdeten Reptilien der Schweiz*. Hrsg. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern, und Koordinationsstelle für Amphibien- und Reptilienschutz in der Schweiz, Bern. BUWAL-Reihe: Vollzug Umwelt.

- Moser, A., Graber, C., Freyvogel, T.A. (1984). Observations sur l'ethologie et l'evolution d'une population de *Vipera aspis* (L.) au nord du Jura Suisse. *Amphibia-Reptilia* **5**: 373-393.
- Naulleau, G. (1965). Etude préliminaire de l'activité de *Vipera aspis* dans la nature. *Contribution aux Journées d'Etude de l'U.I.S.B. de Marseille* 147-154.
- Naulleau, G. (1966). Etude complémentaire de l'activité de *Vipera aspis* dans la nature. *Vie et Milieu* **17**: 461-509.
- Naulleau, G. (1968). Activité de *Vipera aspis* dans la nature et au laboratoire. *Annales Epiphyties* **19**: 207-217.
- Naulleau, G. (1975). Cycle d'activité de *Vipera aspis* (L.) et choix entre des conditions climatiques naturelles et artificielles. *Vie et Milieu* **25**: 119-136.
- Naulleau, G. (1976). Note sur une portée exceptionnelle chez une vipère capturée dans les Deux-Sèvres. *Annales de la Société des Sciences Naturelles de Charente-Maritime* **6**: 201-202.
- Naulleau, G. (1979). Etude biotélémétrique de la thermorégulation chez *Vipera aspis* (L.) élevée en conditions artificielles. *Journal of Herpetology* **13**: 203-208.
- Naulleau, G. (1981). Détermination des périodes de l'ovulation chez *Vipera aspis* et *Vipera berus* dans l'ouest de la France, étudiée par radiographie. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de l'Ouest de France* **3**: 151-153.
- Naulleau, G. (1982). Action de la temperature sur la digestion chez les vipères espagnoles du genre *Vipera*. *Publicaciones Centro Pirenaico Biologia Experimental* **13**: 89-94.
- Naulleau, G. (1983). Action de la température sur la digestion chez cinq espèces de vipères européennes du genre *Vipera*. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **108**: 47-58.
- Naulleau, G. (1984). Les serpents de France. *Rev. Franc. D'Aquar. Herpetol.* **11**: 1-56.
- Naulleau, G. (1986). Effects of temperatura on gestation in *Vipera aspis* and *V. berus* (Reptilia: Serpentes). Pp. 489-494. En: Rocek, Z. (Ed.). *Studies in Herpetology (Proceedings of the Third Ordinary General Meeting of the Societas Euripaea Herpetologica)*. Charles University. Prague.
- Naulleau, G., Bonnet, X. (1995). Reproductive ecology, body fat reserves and foraging mode in females of two contrasted snake species: *Vipera aspis* (terrestrial, viviparous) and *Elaphe longissima* (semi-arboreal, oviparous). *Amphibia-Reptilia* **16**: 37-46.
- Naulleau, G., Bonnet, X., Duret, S. (1996). De'placements et domaines vitaux des femelles reproductrices de Vipère áspic *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae) dans le centre ouest de la France. *Bulletin Société Herpetologie de France* **78**: 5-18.
- Neumeyer, R. (1987). Density and seasonal movements of the adder (*Vipera berus* L.1758) in a subalpine environment. *Amphibia-Reptilia* **8**: 259-276.
- Nilson, G., Andrén, C. (1997). Evolution, systematics and biogeography of Palaearctic vipers. Pp. 31-42. En: Thorpe, R.S., Wüster, W., Malhotra, A. (Eds.). *Venomous snakes. Ecology, evolution and snakebite*. The Zoological Society of London, Oxford.

- Oliveira M.E., Brito, J.C., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Loureiro, A., Martins, H.R., Pargana, J., Paulo, O.S., Rito, P., Teixeira J. (2005a). *Vipera latastei*. Pp 139-140. En: Cabral, M.J. (Coord.), Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, A.I., Rogado, L., Santos-Reis, M. (Eds.). *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Capítulo Anfíbios e Répteis*, I.C.N., Lisboa.
- Oliveira M.E., Brito, J.C., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Loureiro, A., Martins, H.R., Pargana, J., Paulo, O.S., Rito, P., Teixeira J. (2005b). *Vipera seoanei*. Pp 141-142. En: Cabral, M.J. (Coord.), Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, A.I., Rogado, L., Santos-Reis, M. (Eds.). *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Capítulo Anfíbios e Répteis*, I.C.N., Lisboa.
- Palau, J. (1974). Nuevos datos sobre la distribución geográfica de los anfibios y reptiles ibéricos. *Doñana, Acta Vertebrata* **1**: 19-27.
- Parellada, X. (1995a). Status of *Vipera aspis* and *Vipera latastei* (Viperidae, Reptilia) in Catalonia (NE Spain). Pp. 328-334. En: Llorente, G., Montori, A., Santos, X., Carretero, M.A. (Eds.). *Scientia Herpetologica*. Asociación Herpetológica Española, Barcelona.
- Parellada, X. (1995b). About the apparent inexistence of a spring mating in the Catalan population of *Vipera latastei* (Reptilia: Viperidae), and note about the reproductive success. Pp. 250-254. En: Llorente, G., Montori, A., Santos, X., Carretero, M.A. (Eds.). *Scientia Herpetologica*. Asociación Herpetológica Española, Barcelona.
- Parellada, X. (1998). Aproximació a l'estatus de l'escurçó ibèric (*Vipera latastei*) al Garraf. Pp. 1-23. En: III Trabuada d'Estudiosos del Garraf. Museu de Gava, Diputació de Barcelona.
- Parellada, X., Santos, X. (2002). Caudal luring in free-ranging adult *Vipera latastei*. *Amphibia-Reptilia* **23**: 343-347.
- Pérez-Mellado, V. (1983). La herpetofauna de Salamanca: un análisis biogeográfico y ecológico. *Salamanca, Rev. Est.* **9-10**: 9-78.
- Phisalix, M. (1968). La livrée des vipères de France (d'après des notes manuscrites inédites). *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris* **40**: 661-676.
- Pleguezuelos, J. M. (1986). Distribución altitudinal de los reptiles en las Sierras Béticas orientales. *Revista Española de Herpetología* **1**: 65-83.
- 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.
- Pleguezuelos, J., Sá-Sousa, P., Pérez-Mellado, V., Marquez, R., Cheylan, M., Geniez, P. (2006). *Vipera seoanei*. En: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 15 December 2008.

- Pleguezuelos, J. M., Santos, X. (1997). *Vipera latastei*. Pp. 288-290. En: Pleguezuelos, J.M. (Ed.). *Distribución y biogeografía de los Anfibios y Reptiles en España y Portugal*. Monografías de Herpetología, nº 3. Editorial Universidad de Granada y Asociación Herpetológica Española. Granada.
- Pleguezuelos, J.M., Santos, X. (2002). *Vipera latastei*. Pp. 298 – 300. En: 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 – Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- Pleguezuelos, J.M., Santos, X., Brito, J.C., Parellada, X., Llorente, G.A., Fahd, S. (2007). Reproductive ecology of *Vipera latastei*, in the Iberian Peninsula: Implications for the conservation of a Mediterranean viper. *Zoology* **110**: 9-19.
- Pozio, E. (1980). Contributo alla sistematica di *Vipera aspis* (L.) mediante analisi elettroforetica delle proteine contenute nel veleno. *Natura, Milano* **71**: 28-34.
- Prestit, I. (1971). An ecological study of the viper *Vipera berus* in southern Britain. *Journal of Zoology* **164**: 373-418.
- Rage, J.-C., Saint-Girons, H. (1986). Données biogéographiques: mise en place de la faune et facteurs actuels de la répartition. Pp. 29-32. En: *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France*. Société Herpétologique de France. Paris.
- Roulin, B. (1988). Nichée d'accentuer alpin victim de la vipère aspic? *Nos Oiseaux* **39**: 417-418.
- Saint-Girons, H. (1952). Ecologie et ethologie des vipères de France. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie* **14**: 263-343.
- Saint-Girons, H. (1957). Le cycle sexuel chez *Vipera aspis* (L.) dans l'ouest de la France. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* **91**: 284-350.
- Saint-Girons, H. (1958). Croissance et fécondité de *Vipera aspis* (L.). *Vie et Milieu* **8**: 265-286.
- Saint-Girons, H. (1971). Les vipères d'Europe occidentale. Pp. 609-636. En: *La grande Encyclopédie de la Nature. Les Reptiles, vol XI*. Bordas. Paris.
- Saint-Girons, H. (1974). Le cycle sexual de *Vipera aspis* (L.) en montagne. *Vie et Milieu* **23**: 309-328.
- Saint-Girons, H. (1975). Observations préliminaires sur la thermorégulation des vipères d'Europe. *Vie et Milieu* **25**: 137-168.
- Saint-Girons, H. (1976). Les différents types de cycles sexuels des mâles chez les vipères européennes. *C.R. Académie des Sciences* **282**: 1017-1019.
- Saint-Girons, H. (1977). Systématique de *Vipera latastei* latastei Bosca, 1878 et description de *Vipera latastei gaditana*, subsp. n. (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **84**: 599-607.
- Saint-Girons, H. (1978a). Morphologie externe comparée et systématique des vipères d'Europe (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **85**: 565-595.
- Saint-Girons, H. (1978b). Thermoregulation comparée des vipères d'Europe. Etude biotelemetrique. *La Terre et La Vie* **32**: 417-440.
- Saint-Girons, H. (1979). Les cycles alimentaires des vipères européennes dans des conditions semi-naturelles. *Annales Biologie Animale, Biochimie et Biophysique* **19**: 125-134.

- Saint-Girons, H. (1980a). Biogéographie et évolution des vipères européennes. *Comptes Rendus de la Société de Biogéographie* 496: 146-172.
- Saint-Girons, H. (1980b). Le cycle des mues chez les vipères européennes. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **105**: 551-559.
- Saint-Girons, H. (1980c). Modifications sélectives du régime des vipères (Reptilia, Viperidae) lors de la croissance. *Amphibia-Reptilia* **1**: 127-136.
- Saint-Girons, H. (1981). Cycle annuel et survie de quelques vipères d'Europe. Influence des températures exceptionnellement élevées de l'année 1976. *Vie et Milieu* **31**: 59-64.
- Saint-Girons, H. (1982). Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. *Herpetologica* **38**: 5-16.
- Saint-Girons, H. (1983). Régime et rations alimentaires des serpents. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **108**: 431-437.
- Saint-Girons, H. (1989). *Vipera seoanei*, Lataste, 1879. Pp. 168-169. En: *Atlas de Repartition des Amphibiens et Reptiles de France*, Castanet, J., Guyétant, R. (Eds.). Société Herpétologique de France, Paris.
- Saint-Girons, H. (1992). Strategies reproductrices des viperidae dans les zones temperees fraiches et froides. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **117**: 267-278.
- Saint-Girons, H. (1994). Les risqué de prédation liés à la reproduction chez un Viperidae ovovivipare, *Vipera aspis* L., d'après les observations visuelles. *Amphibia-Reptilia* **15**: 413-416.
- Saint-Girons, H. (1997). Utilisation de l'espace vital par *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae) dans une region de Bocage de l'ouest de la France. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **84**: 5-14.
- Saint-Girons, H., Bea, A., Braña, F. (1986). La distribución de los diferentes fenotipos de *Vipera seoanei* Lataste, 1879, en la región de los Picos de Europa (Norte de la Península Ibérica). *Munibe* **38**: 121-128.
- Saint-Girons, H., Duguy, R. (1976). Écologie et position systématique de *Vipera seoanei* Lataste, 1879. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **101**: 325-339.
- Saint-Girons, H., Duguy, R. (1992). Evolution de la masse corporelle et de la masse relative de corps gras, des ovaires et des oeufs au cours des cycles reproducteurs chez *Vipera aspis*. *Amphibia-Reptilia* **13**: 351-364.
- Saint-Girons, H., Duguy, R., Detrait, J. (1983). Les vipers du sud du Massif Central: morphologie externe et venins. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* **119**: 81-86.
- Saint-Girons, H., Naulleau, G. (1981). Poids des nouveau-nés et strategies reproductrices des vipers européennes. *La Terre et la Vie* **35**: 597-616.
- Salvador, A. (1974). *Guía de los anfibios y reptiles españoles*. ICONA, Madrid.
- Salvador, A., Castroviejo, J., Castroviejo, S., Garzón-Heydt, J., Mejide, M.W., Viedma, M.G. (1970). Primeras notas sobre la herpetofauna del Macizo Ibérico septentrional. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historial Natural (Sección Biológica)* **68**: 123-133.

- Santos, X., Brito, J.C., Sillero, N., Pleguezuelos, J.M., Llorente, G.A., Fahd, S., Parellada, X. (2006). Inferring habitat-suitability areas with ecological modelling techniques and GIS: A contribution to assess the conservation status of *Vipera latastei*. *Biological Conservation* **130**: 416-425.
- Santos, X., Llorente, G.A., Pleguezuelos, J.M., Brito, J.C., Fahd, S., Parellada, X. (2007). Variation in the diet of the Lataste's viper *Vipera latastei* in the Iberian Peninsula: seasonal, sexual and size-related effects. *Animal Biology* **57**: 49-61.
- Saviozzi, P., Zuffi, M.A.L. (1997). An Integrated Approach to the Study of the Diet of *Vipera aspis*. *Herpetological Review* **28**: 23-24.
- Schleich, H.H., Kastle, W., Kabisch, K. (1996). *Amphibians and Reptiles of North Africa*. Koeltz Scientific Publishers.
- Schuett, G.W. (1992). Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers?. Pp. 169-184. En: Campbell, J.A., Brodie Jr., E.D. (Eds.). *Biology of Pitvipers*. Selva, Tyler.
- Schwarz, E. (1936). Untersuchungen über Systematik und Verbreitung der europäischen und mediterranen Ottern. *Behringswerk-Mitteilungen* **7**: 159-355.
- Seigel, R.A., Ford, N.B. (1987). Reproductive ecology. Pp. 210-252. En: Seigel, R.A., Collins, J.T., Novak, S.S. (Eds.). *Snakes. Ecology and Evolutionary Biology*. McGraw Hill, New York.
- Shine, R., Madsen, T. (1994). Sexual dichromatism in snakes of the genus *Vipera*: a review and a new evolutionary hypothesis. *Journal of Herpetology* **28**: 114-117.
- Steward, J.W. (1971). *The Snakes of Europe*. David & Charles Newton, London.
- Tourneville, A. (1881). Etude sur les vipères du groupe *ammodytes-aspis-berus*. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **6**: 38-72.
- Trutnau, L., Böhme, W., Joger, U. (2005). *Vipera (Vipera) aspis*. Pp. 151-185. En: Joger, U., Stümpel, N. (Eds.), *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas; Band 3/IIB, Schlangen (Serpentes) III Viperidae*. AULA-Verlag, Wiebelsheim.
- Ujvári, B., Madsen, T., Kotsenko, T., Olsson, M., Shine, R., Wittzell, H. (2002). Low genetic diversity threatens imminent extinction for the Hungarian meadow viper (*Vipera ursinii rakosiensis*). *Biological Conservation* **105**:127-130.
- Ursenbacher, S., Conelli, A., Golay, P., Monney, J.-C., Zuffi, M.A.L., Thiery, G., Durand, T., Fugamalli, L. (2006). Phylogeography of the asp viper (*Vipera aspis*) inferred from mitochondrial DNA sequence data: Evidence for multiple Mediterranean refugial areas. *Molecular phylogenetics and Evolution* **38**: 546-552.
- Valverde, J. A. (1967). *Estructura de una Comunidad Mediterránea de Vertebrados Terrestres*. Monografías de Ciencia Moderna 1. CSIC.
- Vericad, J. R., Escarré, J. (1976). Datos de alimentación de ofidios en el Levante sur Ibérico. *Mediterranea* **1**: 5-32.
- Vives-Balmaña, M.V. (1984). *Els amfibis i els rèptils de Catalunya*. Ketres. Barcelona.

- Vives-Balmaña, M.V. (1987). Escurçó ibèric. Pp. 186-188. En: Gosàlbez, J. (Ed.). *Amfibis, Rèptils i Mamífers - Història Natural del Països Catalans*. Vol. 13. Enciclopèdia Catalana, Barcelona.
- Vives-Balmaña, M.V. (1990). *Contribució al coneixement de la fauna herpetològica de Catalunya*. Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.
- Whitaker, P.B., Shine, R. (2000). Sources of mortality of large elapid snakes in an agricultural landscape. *Journal of Herpetology*. **34**: 121-128.
- Zaldívar, C., Verdú, J., Irastorza, M.T., Fuente, M.E. (1988). Contribución al atlas provisional de anfibios y reptiles de la Comunidad Autónoma de La Rioja. *Revista Española de Herpetología* **3**: 41-53.
- Zuffi, M.A.L. (1999). Activity patterns in a viviparous snake, *Vipera aspis* (L.), from Mediterranean central Italy. *Amphibia-Reptilia* **20**: 313-318.
- Zuffi, M.A.L. (2002). A critique of the systematic position of the asp viper subspecies *Vipera aspis aspis* (Linnaeus, 1758), *Vipera aspis atra* Meisner, 1820, *Vipera aspis francisciredi* Laurenti, 1768, *Vipera aspis hugyi* Schinz, 1833 and *Vipera aspis zinnikeri* Kramer, 1958. *Amphibia-Reptilia* **23**: 191-213.
- Zuffi, M.A.L., Bonnet, X. (1999). Italian subspecies of the aspic viper, *Vipera aspis*: patterns of variability and distribution. *Italian Journal of Zoology* **66**: 87-95.
- Zuffi, M.A.L., Gentili, A., Cecchinelli, E., Pupin, F., Bonnet, X., Filippi, E., Luiselli, L.M., Barbanera, F., Dini, F., Fasola, M. (2009). Geographic variation of body size and reproductive patterns in Continental versus Mediterranean asp vipers, *Vipera aspis*. *Biological Journal of the Linnean Society* **96**: 383-391.
- Zuffi, M.A.L., Gentili, A., Razzetti, E., Scali, S. (2001). Transition-hybridisation areas in parapatric *Vipera aspis* subspecies from northern Italy. *Biota* **2**: 52.
- Zuffi, M.A.L., Macchia, M., Ioalé, P., Giudici, F. (1999). Winter activity in a coastal population of *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). *Terre Vie* **54**: 365-374.

CHAPTER 2

Formas intermedias y sintopía

Intermediate forms and syntopy

**Formas intermedias y sintopía entre víboras (*Vipera aspis*
y *V. latastei*) en el norte de la península Ibérica**

**Intermediate forms and syntopy among vipers (*Vipera aspis*
and *V. latastei*) in Northern Iberian Peninsula**

Fernando Martínez-Freiría, José C. Brito, Miguel Lizana Avia

The Herpetological Bulletin 97: 14-18. 2006

Formas intermedias y sintopía entre víboras (*Vipera aspis* y *V. latastei*) en el norte de la península Ibérica

Resumen en castellano de

Martínez-Freiría et al. (2006). *The Herpetological Bulletin* **97**: 14-18.

La distribución de las víboras europeas es de tipo parapátrico y sólo se conocen un par de casos de sintopía. En la Península Ibérica existen tres especies de víboras, con varias zonas de contacto entre sus distribuciones, aunque sólo se han detectado ejemplares en aparente simpatría en la zona de contacto entre *V. aspis* y *V. latastei* del sur de los Pirineos. Aunque no se ha detectado realmente sintopía, sí se han observado individuos con morfología intermedia entre ambas especies. En el Alto Ebro se ha sugerido simpatría entre las 3 especies a escala regional (celdas UTM 10x10 km) pero nada se conoce a escala local. En esta nota se describe el hallazgo de ejemplares en sintopía y ejemplares morfológicamente intermedios entre *V. aspis* y *V. latastei* en esta zona de contacto.

El área de estudio cubre 1.200 km² localizados entre el sureste de Santander y el noroeste de Burgos (Fig. 1A). Se trata de una zona de transición entre las regiones eurosiberiana y mediterránea, lo que se traduce en una transición gradual de factores climáticos (como la temperatura y la precipitación) y vegetación.

Entre marzo de 2004 y octubre de 2005 se realizaron transectos a pie, basados en celdas UTM 1x1 km, y en coche a lo largo del área de estudio. Los especímenes capturados fueron clasificados en base a un criterio morfológico que incluía: 1) la elevación y el número de escamas apicales; 2) la forma del dibujo dorsal; 3) el número de marcas dorsales. Cuando presentaron rasgos morfológicos contradictorios o intermedios los especímenes se clasificaron como formas intermedias. Se capturaron un total de 327 especímenes de los que 12 se clasificaron como *V. seoanei*, 138 como *V. aspis* y 124 como *V. latastei*.

V. seoanei se restringe a la zona norte y noroeste de carácter eurosiberiano (Fig. 1B). No se detectó sintopía con las otras especies, lo que se ajusta a lo conocido para las zonas de contacto entre especies no hermanas filogenéticamente. *V. aspis* se distribuye por el centro y noreste, mientras que *V. latastei* lo hace por el sur del área de estudio (Fig. 1B). Ambas especies contactan en simpatría en la zona central del área de estudio (8 celdas UTM 1x1 km), a lo largo de una banda de 15

km orientada de oeste a este, caracterizada por la abundancia de campos abandonados (Fig. 1B y 1C). Cincuenta y tres individuos clasificados como formas intermedias entre *V. aspis* y *V. latastei* (Fig. 2), fueron localizados en 13 celdas UTM 1x1, principalmente dentro de la zona de simpatría (Fig. 1C). No se detectaron formas intermedias en poblaciones cercanas de *V. aspis* hacia el norte o de *V. latastei* hacia el sur, así como tampoco se detectaron formas intermedias entre *V. seoanei* y las otras dos especies. Durante la época de reproducción primaveral se han detectado ejemplares sintópicos de *V. aspis*, *V. latastei* y formas intermedias, formando parte de poblaciones mixtas, lo que sugiere la existencia de hibridación entre ambas especies.

Intermediate forms and syntopy among vipers (*Vipera aspis* and *V. latastei*) in Northern Iberian Peninsula

Fernando Martínez-Freiría¹, José C. Brito^{2,3} and Miguel Lizana Avia¹

¹ Dpto. Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

² CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Instituto de Ciências Agrárias de Vairão, R. Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal

³ Dpto. Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 4099-002 Porto, Portugal

The general distribution pattern of the European vipers is mostly parapatric (Saint-Girons 1980). However, several biogeographical studies conducted in contact zones between the distributions of different species confirm an allopatric distribution at a local scale (Saint-Girons 1975; Saint-Girons 1980; Saint-Girons & Duguy 1976; Duguy & Saint-Girons 1978; Monney 1996; Bea 1985; Naulleau 1986; Brito & Crespo 2002). Only a few cases of syntopy between European vipers have been reported, mostly between *Vipera aspis* and *V. berus*, such as in a narrow band of 1-2 km in the Atlantic-Loire region, west of France (Saint-Girons 1975), and in a 70 ha area in the Pre-Alps, west of Switzerland (Monney 1996).

In the Iberian Peninsula there are three viper species, one Euro-Siberian, *V. seoanei*, and two sibling Mediterranean species, *V. aspis* and *V. latastei* (Garrigues et al. 2005), which have several contact zones in their distribution areas. Biogeographical analysis of contact zones between non-sibling species, such as between *V. seoanei* and *V. latastei* in Peneda-Gerês National Park, north-west Portugal, or between *V. seoanei* and *V. aspis* in the Spanish Bask country, revealed differential habitat selection patterns, even opposite, suggesting an allopatric distribution at the local scale (Bea 1985; Brito & Crespo 2002). The two sibling species, *V. aspis* and *V. latastei*, exhibit a wide contact zone with populations in apparent sympatry south of the Pyrenees, northeast Spain (Pleguezuelos et al. 2002). However, *V. aspis* selects fresh and humid areas in north-faced slopes whereas *V. latastei* selects rocky and dry areas in south-faced slopes, thus no syntopy was detected (Duguy et al. 1979; Pleguezuelos & Santos 2002). In this area, some specimens are difficult to classify as belonging to *V. aspis* or *V. latastei* due to intermediate morphological traits between these vipers in the snout, shape and colour pattern (Duguy et al. 1979; Gosá 1997).

Sympatry between the three Iberian vipers was reported for an area located in the high course of Ebro River (Fig. 1A), between south-eastern of Santander and north-western of Burgos provinces,

northern Spain (Duguy et al. 1979; Barbadillo 1987; Pleguezuelos et al. 2002). In this area, sympatry was reported at a regional scale (10x10 km UTM squares), but nothing was known at the local scale. In this note it is reported syntopy and intermediate morphological traits between the two sibling Iberian vipers for northern Spain.

The study area covers 1.200 km² and it is located in the transition between Euro-Siberian and Mediterranean regions (latitude 42°37.7'N to 42°58.7'N and longitude 3°58.5'W to 3°37.3'W). It consists mostly in limy plateaus excavated by the Ebro River and its tributaries, Rudrón and Panero rivers, forming canyons and sloppy valleys (Fig. 1B). Altitude ranges from 590 to 1256 m.a.s.l. Climate is sub-humid Mediterranean with Central European tendency (Andrade 1990). Although the most representative bioclimatic stage is the Supra-Mediterranean there are elements of the Mountain stage of the Euro-Siberian region, mostly in the northern and north-western areas (Rivas-Martínez 1987). Correspondingly, the climate is characterised by low levels of precipitation, average annual rainfall of 740 mm/year (range: 614-959 mm/year), low average annual minimum temperature (-0.8 °C, ranging from -2.0 to 0.0 °C) and high average annual maximum temperature (25.9 °C, ranging from 22.8 to 28.0 °C) (SIGA 2005).

Between March 2004 and August 2005, visual encounter surveys based in UTM 1x1 km squares and road sampling were performed throughout the study area. Specimens were captured by hand and their geographic location (UTM coordinates in the European-1950 datum) was recorded with a G.P.S. Specimens were sexed, measured, counted for pholidosis, photographed, and classified as *V. seoanei*, *V. aspis*, *V. latastei* or intermediate forms. Criteria for the classification of specimens included a combination of morphological traits: 1) snout elevation and number of apical scales: very small snout with two apical scales in *V. seoanei*, snout slightly upwards with two to three apical scales in *V. aspis* and snout upwards, forming an appendix with three to nine apical scales in *V. latastei* (Bea 1998; Bea & Braña 1998; Braña 1998a; Brito et al. 2005); 2) shape of the dorsal stripe: alternated cross bands with a thin vertebral line (type 0) or narrow angular zigzag (type 1) in *V. aspis* (Bea 1998), wide zigzag (type 2) or rounded-rhomboidal marks running together to form a wavy or zigzag stripe (type 3) in *V. latastei* (Bea & Braña 1998), and short alternated or opposite bands with a wide vertebral line (type 4) in *V. seoanei* (Braña 1998b); 3) number of dorsal marks: 60 to 80 in *V. seoanei*, 45 to 78 in *V. aspis* and 33 to 57 in *V. latastei* (authors, unpublished data). Specimens were classified as intermediate forms when exhibiting contradictory or intermediate morphological traits.

A total of 327 specimens were collected, 12 belonging to *V. seoanei*, 138 to *V. aspis* and 124 to *V. latastei*. *Vipera seoanei* was restricted to the north and north-western zone of Euro-Siberian influence, and occupied pastures and meadows (Fig. 1B). At a local scale, no syntopy was found be-

Figure 1. A) Geographic location of the study area in the Iberian Peninsula. B) Distribution of the three vipers and the intermediate forms between *Vipera aspis* and *V. latastei* based on UTM 1x1 squares. C) Distribution of *V. aspis*, *V. latastei* and intermediate forms in the sympatry area.

tween *V. seoanei* with the other two vipers. This allopatric distribution seems to be similar to the pattern identified for north-western Portugal (Brito & Crespo 2002), where differential habitat selection precludes sympatry. *V. aspis* was distributed throughout the central and north-eastern zone while *V. latastei* occurred in the southern zone (Fig. 1B). Both species selected similar habitats, but *V. aspis* tended to select more humid habitats and with denser vegetation cover than *V. latastei*. *Vipera aspis* and *V. latastei* were located in sympatry in the central zone of the study area, in the middle-lower course of the Rudrón river, lower course of it tributary Sedanillo River and in La Lora Plateau (Fig. 1B), characterized by the abundance of abandoned fields with disaggregated stone walls, herbaceous vegetation and thorny bushes. The sympatry area was a 15 km east-west oriented band and a total of eight UTM 1x1 km squares were detected with the two sibling species present (Fig. 1B and 1C). Fifty three specimens with intermediate morphological characteristics between *V. aspis* and *V. latastei* were collected in 13 UTM 1x1 square mostly into the sympatry area (Fig. 1C). These specimens presented two to five apical scales, the shape of the dorsal stripe

Figure 2. Three specimens collected in the sympatry area classified as intermediate forms between *V. aspis* and *V. latastei*: sub-adult male with two apical scales, dorsal pattern type 2 and 51 dorsal marks (1, 2 and 3); adult male with three apical scales, dorsal pattern mixture of types 1/2, and 48 dorsal marks (4, 5 and 6); adult female with five apical scales, dorsal pattern mixture of types 1/2, and 46 dorsal marks (7, 8 and 9).

including type 1, mixture of types 1/2 and types 2/3, and with 37 to 59 dorsal marks (Fig. 2). Intermediate forms were not observed in nearby populations of *V. aspis* to the north and *V. latastei* to the south (authors personal observation). No intermediate specimens were detected between *V. seoanei* with *V. aspis* or with *V. latastei*.

During spring mating season in the sympatry area some specimens of *V. aspis* and *V. latastei* were found together in syntopy, forming part of mixed populations with typical specimens of each species and intermediate forms. The occurrence of intermediate forms and syntopy between specimens of both species during the reproductive period suggests that hybridization between *V. aspis* and *V. latastei* may occur. In order to enlighten this question and establish the correspond evolutionary scenerio according to allopatric speciation theory (Brown and Lomolino 1998; Garrigues et al. 2005), further studies about gene flow and comparative biology of these two sibling species are currently being developed.

Acknowledgments

This study was partially supported by the project POCTI/BIA-BDE/55596/2004 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal). F. Martínez-Freiría was supported by PhD grant (AP2003-2633) from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain) and J.C. Brito was supported by a Post-doctoral grant (SFRH/BPD/11542/2002) from FCT. Authors acknowledge “Asociación Sociocultural Hoces del Alto Ebro y Rudrón”.

References

- Andrade, A. (1990). *Atlas fitoclimático de España*. Monografías I.N.I.A. 69. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Barbadillo, L.J. (1983). Sobre la distribución de anfibios y reptiles en la provincia de Burgos. *Butlletí Societate Catalana Ictiologia Herpetologia* **5**, 10-17.
- Bea, A. (1985). La repartición de las víboras *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) y *Vipera seoanei* (Lataste, 1879) en el País Vasco. *Cuadernos de sección, Cienc. Nat., Eusko Ikaskunz* **2**, 7-20.
- Bea, A. (1998). *Vipera aspis* In: *Fauna Ibérica. Vol. 10. Reptiles*, pp. 469-480. Salvador, A. (Coordinator). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Bea, A. & Braña, A. (1998). *Vipera latastei* In: *Fauna Ibérica. Vol. 10. Reptiles*, pp. 480-488. Salvador, A. (Coordinator) Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Braña, F. (1998a). Family Viperidae In: *Fauna Ibérica. Vol. 10. Reptiles*, pp. 466-469. Salvador, A. (Coordinator). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Braña, F. (1998b). *Vipera seoanei* In: *Fauna Ibérica. Vol. 10. Reptiles*, pp. 489-497. Salvador, A. (Coordinator). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Brito, J.C. & Crespo, E.G. (2002). Distributional analysis of two vipers (*Vipera latastei* and *V. seoanei*) in a potential area of sympatry in the Northwestern Iberian Peninsula. In: *Biology of the Vipers*, pp. 129-138. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.). Eagle Mountain Publishing.
- Brito, J.C., X. Santos, J.M. Pleguezuelos, S. Fahd, G.A. Llorente & X. Parellada (2005). Morphological variability of the Lataste's viper (*Vipera latastei*) and the Atlas dwarf viper (*Vipera monticola*): patterns of biogeographical distribution and taxonomy. *Amphibia-Reptilia*, in press.
- Brown, J.H. & Lomolino, M.V. (1998). Biogeography. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Duguy, R., Martínez-Rica, J. P., & Saint-Girons, H. (1979). La répartition des vipères dans les Pyrénées et les régions voisines du nord de l'Espagne. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* **115**, 359-377.
- Duguy, R. & Saint-Girons, H. (1978). La répartition des vipères et de quelques autres reptiles sur le plateau de Millevaches (Limousin). *Ann. Soc. Sc. Nat. Charente-Maritime* **6**, 351-354.
- Garrigues, T., Dauga, C., Ferquel, E., Choumet, V., & Failloux, A.-B. (2005). Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**, 35-47.

- Gosá, A. (1997). *Vipera aspis*. In: *Distribución y Biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*, pp. 285- 287. Pleguezuelos, J.M. Monografías Tierra del Sur. Universidad de Granada. Asociación Herpetológica Española.
- Monney, J.-C. (1996). Biologie comparée de *Vipera aspis* L. et de *Vipera berus* L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes Bernoises. *Thèse de Doctorat. Institut de Zoologie, Faculté des Sciences, Université de Neuchatel*.
- Naulleau, G. (1986). Répartition de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* (Reptilia, Viperidae), dans l'ouest de la France (Loire-Atlantique). *Bulletin de la Société Herpetologique de France* **39**; 16-19.
- 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, 584 pp.
- Pleguezuelos, J.M. & Santos, X. (2002). *Vipera latastei*. In: *Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España*, pp. 298 – 300. Pleguezuelos, J. M. Márquez, R. & Lizana, M. (Eds.). Dirección General de Conservación de la Naturaleza – Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- Rivas-Martínez, S. (1987). *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA.
- Saint-Girons, H. (1975). Coexistence de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un probleme de competition interspecifique. *La Terre et la Vie* **29**, 590-613.
- Saint-Girons, H. (1980). Biogéographie et évolution des vipères européennes. *C.R. Société Biogeographie* **496**, 146-172.
- Saint-Girons, H. & Duguy, R. (1976). Écologie et position systématique de *Vipera seoanei* Lataste, 1879. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **101**, 325-339.
- SIGA (2005). Servicio de Información Geográfico Agrario, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Spain. <http://www.mapya.es/es/sig/pags/siga/intro.htm>

Modelación de la distribución y los hábitats

Distribution and habitat modelling

**Modelos de nicho basados en SIG identifican correlaciones
ambientales sustentando una zona de contacto
entre tres especies de víboras europeas**

**GIS-based niche models identify environmental correlates
sustaining a contact zone between three
species of European vipers**

Fernando Martínez-Freiría, Neftalí Sillero, Miguel Lizana, José C. Brito

Diversity and Distributions 14 (3): 452-461. 2008

Modelos de nicho basados en SIG identifican correlaciones ambientales sustentando una zona de contacto entre tres especies de víboras europeas

Resumen en castellano de

Martínez-Freiría et al. (2008). *Diversity and Distributions* **14**: 452-461.

Introducción

Las víboras europeas constituyen un excelente grupo para estudiar patrones de especiación alopátrica, ya que son un grupo monofilético que evolucionó durante las Glaciaciones del Pleistoceno y en la actualidad está representado por tres clados: 1) el clado *Pelias*, que incluye a *Vipera berus* en el norte de Europa y a *V. seoanei* en el norte de la península Ibérica; 2) el clado *aspis*, que incluye a *V. aspis* y *V. latastei* en el mediterráneo occidental; 3) el clado *ammodytes* que incluye a *V. ammodytes* en el mediterráneo oriental.

El rango de distribución general de las víboras europeas es de tipo parapátrico; en las zonas de contacto suele ocurrir una distribución alopátrica y tan sólo han sido detectados unos pocos casos de simpatría. Los factores ambientales intervienen de manera muy notoria en esta distribución, de hecho, en las zonas de contacto, las especies de víboras suelen seleccionar hábitats con diferentes condiciones micro-climáticas, por lo que generalmente no coexisten.

En el Alto Ebro (Norte de España) existe la única zona de contacto conocida entre las tres especies ibéricas (*V. aspis*, *V. latastei* y *V. seoanei*), donde las especies se distribuyen alopátricamente, pero *V. aspis* y *V. latastei* contactan en simpatría en un área de 8 km². En esta área se han detectado individuos con morfología intermedia entre las dos especies en poblaciones sintópicas, lo que sugiere la existencia de hibridación entre *V. aspis* y *V. latastei*. Sin embargo, se desconoce el papel de los factores ambientales en esta zona de contacto.

A pesar de la multitud de literatura existente sobre zonas de contactos y la influencia de los factores ambientales, sólo unos pocos estudios han tratado el tema usando SIG y normalmente en grandes regiones. Los objetivos de este estudio son: 1) identificar como los factores ambientales están correlacionados con la distribución y hábitats de las especies de víboras en el Alto Ebro; 2) identificar áreas potenciales de ocurrencia y simpatría a escala local (celdas 1x1 km).

Métodos

Área de estudio

El área de estudio cubre 1.200 km² en el espacio protegido de las “Hoces del Alto Ebro y Rudrón” y las montañas adyacentes del alto curso del río Ebro (desde 42°37.7'N hasta 42°58.7'N; desde 3°37.3'W hasta 3°58.5'W), en el norte de España (Fig. 1). Se trata de una zona con páramos calcáreos y profundos cañones en la transición entre las regiones eurosiberiana y mediterránea. La altitud va desde los 600 a los 1.250 msnm. El clima es mediterráneo sub-húmedo con tendencia centroeuropea.

Factores ambientales

El área de estudio se dividió en 1.200 celdas UTM 1x1 km y cada celda se caracterizó con 7 variables eco-geográficas (Tabla 1).

Registros de víboras

Entre marzo de 2004 y abril de 2007 se realizaron transectos a pie y en coche, basados en celdas UTM 1x1 km. Se muestrearon un total de 256 celdas UTM 1x1 km (21% del área de estudio), cubriendo la totalidad de la variabilidad ambiental del área de estudio (Fig. 1). Los especímenes fueron capturados a mano, su posición fue anotada por medio de un GPS y se clasificaron, de acuerdo a un criterio morfológico (ver capítulo 2), como *V. aspis*, *V. latastei*, *V. seoanei* o formas intermedias. Cada registro fue inscrito en una base de datos georeferenciada y asignado a su correspondiente celda UTM 1x1 km.

Construcción de los modelos con métodos de Máxima Entropía

Para la construcción de los modelos se utilizaron datos de presencia en el software Maxent 3.0.4 beta, que crea modelos usando el procedimiento de Máxima Entropía: cuando caracteriza los eventos desconocidos con un modelo estadístico, busca aquel que tiene mayor entropía, es decir, aquel que produce la distribución más uniforme pero que infiere con tanta precisión como sea posible los datos observados.

De las 48, 54 y 19 celdas UTM 1x1 km con presencia de *V. aspis*, *V. latastei* y *V. seoanei*, respectivamente, el 80% fueron seleccionadas al azar como datos de entrenamiento y el 20% para testar los modelos. No se utilizaron las formas intermedias, ya que pueden ser híbridos y oscurecer los patrones de selección de hábitat de las especies.

Se crearon un total de 10 modelos multivariados por especie y fueron testados con curvas ROC. Como no existen datos de ausencia, el software seleccionó al azar datos de pseudo-ausencia. El área bajo la curva (AUC) de los gráficos ROC fue utilizada como medida de la exactitud de los modelos. Para determinar la importancia de cada variable en la distribución de las especies se utilizaron 2 indicadores: 1) análisis jackknife de la ganancia media con los datos de entrenamiento y test, así como con los AUC; 2) la media del porcentaje de contribución de cada variable al modelo.

La relación entre la ocurrencia de las especies y las variables fue determinada por examen visual de los perfiles de las curvas de respuesta: perfiles similares entre especies indicarían una respuesta idéntica para determinada variable (lo que podría llevar a simpatría). Para evitar el efecto de las demás variables sobre las curvas de respuesta, se desarrollaron modelos univariados para cada variable.

Mapas de probabilidad de ocurrencia

Los modelos de Máxima Entropía clasifican cada celda UTM 1x1 km con una probabilidad de ocurrencia que varía entre 0 y 1. Para evitar ser subjetivos a la hora de establecer un umbral a partir del cual reclasificar cada celda como probable presencia/ausencia, se aplicó un nuevo método denominado “ensemble forecasting” (agrupamiento de pronósticos), a partir del cual en vez de escoger el mejor modelo, se suman los 10 modelos para cada especie y se generan funciones de distribución de probabilidad.

Para identificar las áreas de probable simpatría entre pares de especies, se usó el consenso de los pronósticos, donde una medida de tendencia central (la media) fue calculada para la combinación de 10 pronósticos. Por lo tanto, los mapas para cada especie fueron superpuestos en el software SIG ArcMap y se reclasificó de acuerdo con un umbral de consenso de un mínimo de 5 pronósticos para una especie y 10 para las otras y un máximo de 10 pronósticos para cada especie.

Resultados

Los modelos de Máxima Entropía identificaron un grupo de variables topográficas y climáticas que explican la distribución de las especies, algunas de las cuales son comunes para varias especies (Table 2, Fig. 2). Además, examinando los perfiles de las curvas de respuesta de las variables, se pueden apreciar patrones similares para pares de especies y patrones específicos para una especie (Fig. 3).

Se identifican áreas de probable ocurrencia para: 1) *V. aspis* en el noreste y en el centro del área de estudio; 2) *V. latastei* en la parte sur; 3) *V. seoanei*, en el norte y centro-oeste, aunque en las

más altas (Fig. 4). Se identifican áreas de potencial simpatría entre: 1) *V. aspis* y *V. latastei* en 76 celdas UTM 1x1 km en el centro del área de estudio; 2) *V. aspis* y *V. seoanei* en 23 celdas UTM 1x1 km dispersas por la zona central; 3) *V. latastei* y *V. seoanei* en 2 celdas UTM 1x1 km en el oeste y centro (Fig. 5).

Discusión

Varios factores ambientales están correlacionados con la distribución de las especies en el Alto Ebro; algunos factores impiden el contacto, actuando como barreras al flujo genético, y otros favorecen la simpatría, permitiendo la coexistencia, e incluso, la hibridación, entre los diferentes pares de especies (ej. precipitación y pendiente).

Los resultados obtenidos en el Alto Ebro son coherentes respecto a los estudios cualitativos existentes sobre la importancia de los factores ambientales en las zonas de contacto: las especies de origen mediterráneo seleccionan ambientes diferentes a las especies eurosiberianas; no obstante, *V. aspis* parece seleccionar ambientes intermedios entre *V. latastei* y *V. seoanei*. Los patrones de selección de hábitat están relacionados con los rasgos fisiológicos de cada especie, por lo que es necesario obtener datos sobre termorregulación y reproducción para comprender como los factores ambientales ejercen presiones selectivas sobre las especies a escala local.

El patrón de distribución de las especies de víboras en el Alto Ebro es similar al encontrado en otras zonas de contacto en Europa. Este patrón distribucional replica las relaciones filogenéticas existentes entre las tres especies, en cuanto a que, las barreras ecológicas entre especies no hermanas filogenéticamente parecen ser muy fuertes y sólo para el par *aspis-latastei* se obtiene un área probable de potencial de simpatría.

En esta área de simpatría aparecen distribuidas víboras con morfología intermedia entre *V. aspis* y *V. latastei*; el hallazgo en sintopía de formas intermedias y “formas verdaderas” en poblaciones mixtas durante la época de reproducción primaveral sugiere la existencia de hibridación entre *V. aspis* y *V. latastei*. Normalmente, la partición del hábitat evita la competencia interespecífica y la hibridación en las zonas de contacto, por lo que en la zona de simpatría del Alto Ebro las dos especies y las formas intermedias han de estar compitiendo por las presas, espacio e incluso el apareamiento, como se ha registrado en otros ofidios simpátricos.

Por lo tanto, la distribución de las víboras en la zona de contacto del Alto Ebro resulta aparentemente del balance entre las presiones ejercidas por los factores ambientales y, en el área de simpatría, probablemente por la competencia interespecífica.

La metodología utilizada en este estudio ha resultado exitosa y, por lo tanto, debería ser útil a la hora de analizar otras zonas de contacto tanto entre víboras, como entre otras especies filogenéticamente cercanas.

GIS-based niche models identify environmental correlates sustaining a contact zone between three species of European vipers

F. Martínez-Freiría¹, N. Sillero^{2,3}, M. Lizana¹ and J.C. Brito²

¹Departamento Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain,

²CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Instituto de Ciências Agrárias de Vairão, R. Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal,

³Departamento de Matemática Aplicada, Centro de Investigação em Ciências Geo-Espaciais (CICGE) da Universidade do Porto, R. Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal

Abstract

The current range of European vipers is mostly parapatric but local scale allopatric distribution is common and few cases of sympatry are known. In the High Course of Ebro River, northern Spain, there is a contact zone between *Vipera aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei*. Sympatry was detected between *aspis* and *latastei* and also specimens with intermediate morphological traits. Presence-data at a local-scale (1x1 km) and ecological niche-based models manipulated in a GIS were used to: 1) identify how environmental factors correlate with the distribution of the three vipers and with the location of the sympatry area, and 2) identify potential areas for viper occurrence and sympatry. Ensemble for casting with 10 maximum entropy models identified a mixture of topographical (altitude, slope), climatic (precipitation, evapotranspiration, minimum and maximum temperature) and habitat factors (land cover) as predictors for viper occurrence. Similar predicted probabilities according to the variation of some environmental factors (indicating probable sympatry) were observed only for *aspis-latastei* and *aspis-seoanei*. In fact, areas of probable occurrence of vipers were generally allopatric but probable sympatry between vipers was identified for *aspis-latastei* in 76 UTM 1x1 km squares, for *aspis-seoanei* in 23 squares and *latastei-seoanei* in two squares. Environmental factors correlate with the location of this contact zone by shaping the species range: some enhance spatial exclusion and constrain distribution to spatially non-overlapping ranges, while others allow contact between species. The distribution in the contact zone apparently results from the balance between the pressures exerted by the different environmental factors and in the sympatry area probably by interspecific competition. Further ecological and genetical data are needed to evaluate the dynamics of the probable hybrid zone. GIS and niche-modelling tools proved to be powerful tools to identify environmental factors sustaining the location of contact zones.

Keywords: Burgos, contact zone, ecological barriers, GIS, Maximum Entropy models, snakes, Viperidae

Introduction

Allopatric speciation is perhaps the simplest and most frequent process of speciation (Brown & Lomolino, 1998). When populations are geographically isolated, lack of gene flow allows the development of regional genetic differences in response to either natural selection or genetic drift. In such cases, allopatric populations may become reproductively isolated preventing gene flow to occur when populations meet in secondary contact (Schluter, 2001). During the Pleistocene ice ages of the Quaternary, ancestors of many species experienced allopatric speciation processes in southern European refugia (Taberlet *et al.*, 1998). Ecological barriers or competing species later hampered the northwards expansion during warm inter-stages (Hewitt, 1996).

European vipers are an interesting group to study allopatric patterns of speciation. They constitute a monophyletic group differentiated from other Eurasian vipers in the early Miocene and evolved during the Quaternary dynamic scenario (Lenk *et al.*, 2001; Garrigues *et al.*, 2005). The expansion-contraction of ice shaped the distribution of different forms, the location of population refugia, and established three allopatric clades: 1) *Pelias* group in northern Europe, including *Vipera berus* in almost all northern Europe and *V. seoanei* in northern Iberian peninsula; 2) *V. aspis* complex in western Mediterranean, including *V. aspis* in the Italian peninsula, southern France and north-eastern Iberian peninsula, and *V. latastei* in the Maghreb and in almost all Iberian peninsula; and 3) *V. ammodytes* complex in the Balkans (Garrigues *et al.*, 2005).

The current range of European vipers is mostly parapatric and, at a broad scale (10x10 km grid cells or larger), several contact zones (i.e. areas where the range of species meet and may overlap or not) between distributions of the different species are known (Saint-Girons, 1980). Nevertheless, biogeographical studies conducted at local scale reported an allopatric distribution pattern (Duguy & Saint-Girons, 1978; Bea, 1985; Naulleau, 1986) and few cases of sympatry (i.e. areas where species overlap their geographic ranges) have been described; usually over areas of less than 1km² (Saint-Girons, 1975; Monney, 1996). Environmental factors, such as altitude or precipitation, are correlated with the range of vipers in contact zones (Brito & Crespo, 2002; Guisan & Hofer, 2003), thus, vipers tend to select structurally different habitats and with distinct microclimatic conditions (Reinert, 1984a; Brito & Crespo, 2002). Thus, in most contact zones, their patterns of habitat selection linked with typical sedentary behaviour can promote lack of sympatry.

The high course of the Ebro river (hereafter High Ebro), northern Spain, is the only known contact zone between the three Iberian vipers, *V. aspis* (Linnaeus, 1758), *V. latastei* (Boscá, 1878) and *V. seoanei* (Lataste, 1879). A recent survey of the region at a local scale (1x1 km grid cells), detected *V. aspis* in the north-eastern and central parts of the study area, *V. latastei* in the southern part and *V. seoanei* in the north-western part (Martínez-Freiría *et al.*, 2006). The typical allopatric

distribution pattern at local scale was found for the phylogenetically distantly-related pairs, *aspis-seoanei* and *latastei-seoanei* (Lenk *et al.*, 2001; Garrigues *et al.*, 2005). However, sympatry was detected for the closely-related *aspis-latastei*, in an area of 8km² along the middle course of the rivers Rudrón and Sedanillo (Fig. 1; Martínez-Freiría *et al.*, 2006). In fact, specimens with intermediate morphological characteristics (similar scale counts and colour pattern) were found in syntopic populations, suggesting that hybridization could occur between *V. aspis* and *V. latastei* (Martínez-Freiría *et al.*, 2006). However, the role of environmental factors on the dynamics of the High Ebro contact zone is unknown, particularly, how environment is related with the species range and act as a potential ecological barrier to gene flow. Also, the multi-species scenario for the High Ebro is especially suitable to test the effects of environmental barriers in the location of contact zones.

There is a huge literature on contact zones in a multitude of taxa, and many important papers on the influence of environmental factors (e.g. Reinert, 1984a; Bishop *et al.*, 2002). However, few studies have addressed this relationship spatially, using Geographical Information System (GIS) tools (but see Anderson *et al.*, 2002; Swenson, 2006), and usually these studies performed over broad regions, such as continents (but see Brito & Crespo, 2002). In this context, the objectives of this study are to: 1) identify how environmental factors correlate with the distribution and the habitats selected by *V. aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei* in the High Ebro, and 2) identify potential areas for viper occurrence and sympatry at a local scale (1x1 km grid cells). Ecological niche-based models will be manipulated in a GIS to identify the environmental factors correlated with the location of the contact zone and sympatry area.

Methods

Study area

The study area covers the “Hoces del Alto Ebro y Rudrón” (“Natura 2000” network of European priority conservation areas) and adjacent mountains with a total area of 1200 km² (latitude: N42° 37.7’ to N42° 58.7’; longitude: W3° 37.3’ to W3° 58.5’), located in the high course of the Ebro river, northern Spain (Figure 1). The area consists of calcareous plateaus excavated by the Ebro river and its tributaries, Rudrón and Panero, forming canyons and steep valleys. Altitude ranges from 600 to 1250 m. Climate is sub-humid Mediterranean with Central European tendency. The most representative bioclimatic stage is the Supra-Mediterranean but there are also elements of the Mountain stage of the Euro-Siberian region (for details see Martínez-Freiría *et al.*, 2006).

Figure 1. Presence records of *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758), *V. latastei* (Boscá, 1878) and *V. seoanei* (Lataste, 1879) and intermediate forms between *V. aspis* and *V. latastei* at a 1x1 km scale in the High Ebro, northern Spain. No vipers - sampled squares where vipers were not detected.

Environmental factors

The study area was divided in 1200 UTM 1x1km squares and each square was characterised with a set of 7 uncorrelated ($r < 0.750$ in all cases) environmental factors (Table 1). Ecogeographical variables (hereafter EGV) known to affect the distribution of viperid snakes, including *V. aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei*, were selected for analysis (Brito & Crespo, 2002; Guisan & Hofer, 2003; Santos *et al.*, 2006; N. Sillero & J.C. Brito, unpubl. data). Four types of EGVs were considered: 1) topographical – altitude and slope derived from a digital elevation model (USGS, 2004); 2) climatic – a set of three global climate grids and one regional (evapotranspiration) derived from Worldclim v1.4 (Hijmans *et al.*, 2005) and SIGA (2005), respectively; and 3) habitats –

a land cover EGV composed of 14 months (1999 to 2000) satellite data acquired by the VEGETATION sensor on-board SPOT 4 satellite (GLC, 2003).

With the exception of Land cover EGVs were continuous and quantitative. The resolution of all EGVs was decreased to a grid cell size of 1x1 km, using the Aggregate function of ArcMap 9.0 GIS (ESRI, 2004), where each output grid cell of the new EGV contains the mean value of the input cells that were encompassed by the extent of the output cell.

Viper records

Between March 2004 and April 2007, visual encounter surveys and random road sampling based on the 1x1 km UTM grid were performed throughout the study area. Sampled squares were spatially distributed across the study area in order to cover the range of environmental variability (Fig. 1). In total, 256 squares were sampled, representing 21% of the study area.

Specimens were captured by hand and their geographic location (UTM coordinates; European-1950 datum) was recorded with a GPS. Specimens were classified as *V. aspis*, *V. latastei*, *V. seoanei* or intermediate forms between *V. aspis* and *V. latastei* according to a combination of morphological characters: snout elevation, number of apical scales, shape of the dorsal stripe and number of dorsal marks. Specimens were classified as intermediate when exhibiting contradictory or intermediate morphological traits (for details see Martínez-Freiría *et al.*, 2006). Viper records were inscribed in a georeferenced database and assigned to the corresponding 1x1 km UTM square.

Table 1. Ecogeographical variables used for model the distribution of *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758), *V. latastei* (Boscá, 1878) and *V. seoanei* (Lataste, 1879) in the High Ebro, northern Spain.

Name	Units and classes	Source
Altitude	From 600 to 1250 m a.s.l.	USGS (2004)
Slope	From 0 to 45 %	USGS (2004)
Precipitation	Annual average, from 698 to 908 mm/year	Hijmans <i>et al.</i> (2005)
Evapotranspiration	Annual average, from 587 to 673 mm/year	SIGA (2005)
Min temperature	Minimum temperature of the coldest month, from -1.5 to 2.1 °C	Hijmans <i>et al.</i> (2005)
Max temperature	Maximum temperature of the warmest month, from 22 to 24.5 °C	Hijmans <i>et al.</i> (2005)
Land cover	6 classes: broadleaved and deciduous forests, needle-leaved and evergreen forests, mixed leaf forests, shrubs, herbaceous, cultivated areas	GLC (2003)

Model building with Maximum entropy methods

The spatial behaviour and activity patterns of vipers complicate the accurate determination of absences in a given square. The home range size is very small, the active season is short and individuals remain mostly inside bushes through the year (Brito, 2003a,b). Therefore, to identify the environmental factors that are related to the distribution of each viper and locate areas of probable occurrence the Maximum entropy was used. This is a general-purpose machine learning method that uses presence-only occurrence data (Phillips *et al.*, 2004, 2006). Models were developed with Maxent 3.0.4 beta (<http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent>), which is particularly well suited to noisy or sparse information, as is typical of species' occurrence data, and capable of dealing with continuous and categorical EGVs at the same time (Phillips *et al.*, 2006). Also, comparative analyses of model performance revealed that Maximum entropy models consistently outperform more established methods, including presence-only methods (Bioclim, Domain) and presence-absence methods (GAMs, GLMs), especially when samples sizes are low (Elith *et al.*, 2006; Hernandez *et al.*, 2006).

Essentially, Maximum entropy models are based on a simple reasoning: when characterizing some unknown events with a statistical model, it should always be chosen the one that has maximum entropy, i.e., the one that produces the most uniform distribution but still infers as accurately as possible the observed data (e.g. maximise entropy for a given chi-square value). Maxent estimates the range of species with the constraint that the expected value of each EGV (or its transform and/or interactions) should match its empirical average, i.e. the average value for a set of sample points taken from the species-target distribution (Phillips *et al.*, 2004, 2006). Maxent weights each EGV by a constant and the estimated probability distribution is exponential in the sum of the weighed features, divided by a scaling constant to ensure that the probability values range from 0.0 to 1.0 and sum to 1.0. The program starts with a uniform probability distribution (gain = 0) and iteratively alters one weight at a time to maximize the likelihood of the occurrence dataset. The gain is a measure of the likelihood of the samples. The algorithm converges to the optimum probable distribution, thus, the gain can be interpreted as representing how much better the distribution fits the sample points than the uniform distribution does (Phillips *et al.*, 2004, 2006). From the 48, 54 and 19 UTM 1x1km squares with presence records of *V. aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei*, respectively, 80% of the presence records were randomly selected by Maxent as training data and 20% reserved for model testing. Therefore, 39, 44 and 16 training records were used for *V. aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei*, respectively, and 9, 10 and 3 test records were used for *V. aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei*, respectively. The intermediate individuals were not used in the analysis as these vipers might be hybrids and bias the ecological models for the true forms.

Due to low sample size, 10 multivariate Maximum entropy models were run with auto-features and tested with Receiver Operated Characteristics (ROC) plots. Since absence data was not available from the fieldwork, it was selected uniformly at random by Maxent from the background squares (Phillips *et al.*, 2006). The Area under the Curve (AUC) of the ROC plot was taken as a measure of the overall fit of the models (Liu *et al.*, 2005). The importance of each EGV for explaining the distribution of vipers was determined by: 1) jackknife analysis of the average gain with training and test data and also with AUC. EGVs were excluded in turn and a model created with the remaining variables; then a model was created using each individual variable, and in addition, a model was created using all variables; and 2) average percent contribution of each EGV for the models. In each iteration of the training algorithm, the increase or decrease in regularized gain was added or subtracted, respectively, to the input of the corresponding variable, giving a heuristic estimate of EGV contribution for the model (Phillips *et al.*, 2006).

The relationship between occurrence of vipers and EGVs was determined by the visual examination of the profiles of response curves (see Austin, 1987). Similar profiles between two vipers for a given EGV were taken as an indication of identical relationships between the occurrence of these species and the range of variation of the EGV. This would indicate also the possible occurrence of sympatry within the range of values of the EGV equally selected by both species. A distinct profile of a viper in relation to the others vipers was taken as an indication of a divergent relationship and possible exclusion of that species within the range of values of the EGV selected exclusively. Response curves represent the exponent changes, i.e. predicted suitability, as each EGV varies by keeping all other variables at their average sample value (Phillips *et al.*, 2004). Therefore, univariate models were developed using each EGV solely in order to avoid possible biases by other correlated EGVs.

Probability of occurrence maps

The Maximum entropy model classifies squares with a continuous value of probability of occurrence between 0 and 1. Traditionally, a threshold is estimated to reclassify probability of occurrence maps into areas of probable presence/absence (e.g. Brito & Crespo, 2002). However, the issue of selecting an optimized threshold with Maxent and selecting the “best” model from a model ensemble is rather subjective (Phillips *et al.*, 2004, 2006). Therefore, instead of picking the “best” model from an ensemble, a more promising approach is to explore the resulting range of projections, a procedure known as ensemble forecasting (Araújo & New, 2007). With this method, the 10 raw models for each species were added to generate probability distribution functions, i.e. a synthetic combined forecast of all models showing the likelihood of species presence.

To identify areas of probable sympatry between pairs of vipers the consensus forecasting was used, where a measure of the central tendency (the mean) was calculated for the ensemble of 10 forecasts. The rationale behind consensus forecasts is that, in averaging several models, main patterns of distribution emerge from the probably biased individual models (Araújo & New, 2007). Therefore, the synthetic maps for each viper were overlaid in the ArcMap GIS and reclassified according to a consensus threshold of a minimum of five forecasts for one species and 10 for the other species to a maximum of 10 forecasts for each species.

Results

The Maximum entropy models identified a set of topographical and climatic EGVs explaining the distribution of vipers (Table 2, Fig. 2). The distribution of *V. aspis* is related to altitude, slope, precipitation, evapotranspiration and land cover; *V. latastei* is related to slope, precipitation, evapotranspiration and maximum temperature; and *V. seoanei* is related to altitude, slope, precipitation, evapotranspiration and minimum temperature. The distribution of vipers is influenced by common EGVs, such as altitude, slope, precipitation and evapotranspiration (Table 2, Fig. 2).

Table 2. Average (min – max) percent contribution of each variable and average (min - max) training and test AUC for the ten Maximum Entropy models for *Vipera aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei* in the High Ebro, northern Spain.

	<i>V. aspis</i>	<i>V. latastei</i>	<i>V. seoanei</i>
Altitude	5.76 (3.0 - 8.5)	2.56 (1.1 - 4.4)	7.67 (4.0 - 14.5)
Precipitation	12.52 (10.0 - 19.7)	54.80 (50.9 - 57.5)	20.28 (13.4 - 27.3)
Evapotranspiration	44.71 (40.5 - 48.9)	16.53 (14.8 - 18.8)	17.95 (12.5 - 24.7)
Land Cover	14.55 (10.9 - 17.6)	0.89 (0.3 - 1.6)	2.15 (0.4 - 5.4)
Slope	9.58 (4.3 - 16.1)	9.65 (5.7 - 16.0)	16.62 (11.2 - 20.0)
Max Temperature	4.85 (2.7 - 8.9)	7.97 (1.4 - 14.2)	6.25 (3.4 - 10.0)
Min Temperature	7.99 (5.0 - 10.5)	7.60 (5.7 - 9.9)	29.10 (21.8 - 41.7)
Training AUC	0.915 (0.903 - 0.927)	0.951 (0.943 - 0.960)	0.961 (0.946 - 0.970)
Test AUC	0.782 (0.707 - 0.865)	0.873 (0.809 - 0.935)	0.780 (0.708 - 0.923)

The profiles of the response curves for the EGVs related to the distribution of two or more species revealed similar patterns for pairs of vipers (Fig. 3): 1) *V. aspis* and *V. latastei* occur more frequently in steeper areas; 2) *V. aspis* and *V. seoanei* occur in areas with average precipitation above 750 mm/year and evapotranspiration between 590 and 620 mm/yr; and 3) *V. latastei* and *V. seoanei* occur in areas with distinct environmental characteristics (Fig. 3). In comparison with the remaining vipers, specific patterns were observed: 1) *V. aspis* occurs mostly in areas with

evapotranspiration above 620 mm and less frequently above 1000 m of altitude; 2) *V. latastei* occurs less frequently in areas with average precipitation above 750 mm/year and evapotranspiration also above 660 mm; and 3) *V. seoanei* occurs mostly in flat areas and also above 1000 m of altitude (Fig. 3).

The ROC plots for the training dataset exhibited average AUCs above 0.910 for all species, whereas average AUCs for test dataset were lower, but all above 0.780 (Table 2).

Areas of probable occurrence of vipers were identified for: 1) *V. aspis* in the north-eastern and central parts of the study area, along the Ebro, middle and lower Rudrón and lower Sedanillo rivers; 2) *V. latastei* in the southern part, along the Rudrón and Sedanillo; 3) *V. seoanei* in the northern and central-western parts, along the Panero river and Zamanzas valley, and in isolated patches of mountain peaks (Fig. 4). Areas of potential sympatry between vipers were identified for: 1) *V. aspis* and *V. latastei* in 76 UTM 1x1 km squares located in the central part of the study area; 2) *V. aspis* and *V. seoanei* in 23 squares scattered through the central part; 3) *V. latastei* and *V. seoanei* in two squares located in the western-central part (Fig. 5).

Figure 2. Jackknife results for 10 Maximum entropy models of the distribution of *Vipera aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei* in the High Ebro, northern Spain. For each variable it is presented the difference in average gain and AUC on test data between models built without a given variable and models built with only that variable. Variables with smaller differences both in gain and AUC are the most related to the distribution of each species.

Discussion

Environmental factors are correlated with the dynamic range scenario of vipers in the High Ebro. Some factors enhance spatial exclusion for some species pairs while favouring sympatry for others. For instance, precipitation hampers the contact of *V. latastei* with *V. aspis* and *V. seoanei*, and facilitates sympatry among the latter vipers. The same relation occurs with slope but for a different pair of species: contact of *V. seoanei* with *V. aspis* and *V. latastei* is hindered above 10% of slope but promoted between the latter vipers. More interestingly, altitude and evapotranspiration support sympatry between *V. aspis* and *V. seoanei* below 1000 m and below 620 mm, respectively, but favour spatial exclusion above these thresholds. Thus, some factors constrain the distribution of vipers in the High Ebro to spatially non-overlapping ranges, acting as ecological barriers to gene flow, while others facilitate sympatry allowing spatial coexistence and even hybridization.

Figure 3. Response curves for the environmental factors related to two or more vipers in the High Ebro, northern Spain. *Vipera aspis* (—), *V. latastei* (---) and *V. seoanei* (.....).

Studies examining the qualitative importance of environmental factors in contact zones between European vipers (but see Brito & Crespo, 2002) revealed distinct habitat selection patterns according to phylogenetical relationships. Species of Mediterranean origin, such as *V. aspis*, *V. latastei* or *V. ammodytes*, tend to occur in warmer and dryer habitats located at lower altitudes, in comparison with species of Euro-Siberian origin, such as *V. berus*, *V. seoanei* or *V. ursinii*, which are usually found in fresher and more humid habitats located at higher altitudes (Saint-Girons, 1975, 1980;

Duguy *et al.*, 1979; Bea, 1985; Monney, 1996). In the High Ebro, *V. latastei* and *V. seoanei* replicate these patterns of habitat selection, but *V. aspis* exhibits an intermediate selection pattern between these two vipers, occurring in warmer (high levels of slope and evapotranspiration) and more humid (high levels of precipitation) areas located at lower altitudes. Distinct habitat selection patterns are usually related to species physiological traits as a response to environmental variability. For instance, precipitation and temperature (both minimum and maximum) affect the duration of the active season of vipers, and, consequently, feeding and growth rates, gestation period, and reproductive frequency (Saint-Girons, 1975, 1980). Data on thermoregulation and reproductive traits are needed to understand how environmental factors exert selective pressures on both vipers at local-scale.

Figure 4. Probability density function with the likelihood of occurrence of *Vipera aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei* in the High Ebro, northern Spain, at a 1x1 km scale estimated by the ensemble of 10 Maximum Entropy models.

The general allopatric distribution pattern of vipers in the High Ebro is similar to other contact zones in Europe. Only a few cases of sympatry have been reported, mostly between *Vipera aspis* and *V. berus*: a narrow band of 1-2 km in the Atlantic-Loire region, west of France (Saint-Girons, 1975), and in a 70 ha area in the Pre-Alps, west of Switzerland (Monney, 1996). The distribution pattern in the High Ebro also replicates the evolutionary relationships among European vipers (Lenk *et al.*, 2001; Garrigues *et al.*, 2005). No sympatry was found between the phylogenetically distantly-related viper, *V. seoanei*, and *V. aspis* or *V. latastei* (Martínez-Freiría *et al.*, 2006), and areas of potential sympatry identified in this study between *V. seoanei* and the other two vipers were small (less than 23 km²). Thus, ecological barriers among non-sibling vipers appear to be

very strong. For instance, in contact zones between *V. latastei* and *V. seoanei* in the Portuguese Gerês mountains or between *V. aspis* and *V. seoanei* in the Spanish Bask country, no sympatry was detected and differential habitat selection patterns, even opposite, were suggested as responsible for the allopatric distribution at local scale (Bea, 1985; Brito & Crespo, 2002).

Sympatry between the phylogenetically closely-related *V. aspis* and *V. latastei* was found in the High Ebro over a relatively large area (8 km², Martínez-Freiría *et al.*, 2006), and the current study identified a potential sympatry area of 76 km². Intermediate vipers (n= 13 squares) were mostly found in this potential area (n= 9 squares) or in contiguous localities (n= 3 squares) (Fig. 5). Specimens of intermediate and true forms were found together during the mating season (Martínez-Freiría *et al.*, 2006) suggesting the occurrence of hybridization. Usually, habitat partition avoids interspecific competition and ultimately reproductive isolation in sympatric vipers (Luiselli, 2006). However, the ecological-niche model indicates that habitats along Rudrón and Sedanillo river valleys present environmental traits favouring population mixture. In these areas, vipers are probably competing for prey, thermoregulation spots, hibernation shelters and probably mates, as recorded for other sympatric snakes (Reinert, 1984b; Beck, 1995; Luiselli, 2002, 2006). Thus, the distribution of vipers in the contact zone apparently results from the balance between the pressures exerted by different environmental factors and in the sympatry area probably by interspecific competition. Reproductive isolation mechanisms, including chemical signalling and zygote viability,

Figure 5. Consensus forecast showing the area where at least half (the mean) of the 10 Maximum Entropy models predict the presence of vipers in the High Ebro, northern Spain, at a 1x1 km scale. Areas of probable sympatry (*Vipera aspis* - *V. latastei*, *V. aspis* - *V. seoanei*, and *V. latastei* - *V. seoanei*) were estimated by the ensemble of 15 to 20 forecasts, i.e. sympatry areas ranged from a minimum of five forecasts for one species and 10 for the other to a maximum of 10 forecasts for each species.

fitness of probable hybrids should be extremely important in the dynamics of this contact zone, as suggested for other sympatric taxa (Shine *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2006).

Ecological niche-based models developed in a spatial context identified environmental factors correlated with each viper range in the High Ebro contact zone. The combination of these models with GIS has been used successfully to analyse hybrid zone dynamics in other taxonomic groups (Swenson & Howard, 2005; Swenson, 2006). Therefore, such models would be useful to identify other potential sympatry areas in southern Pyrenees, where *V. aspis* and *V. latastei* also exhibit a wide contact zone. Although *V. aspis* tends to select fresh and humid areas in north-faced slopes whereas *V. latastei* selects rocky and dry areas in south-faced slopes (Duguy *et al.*, 1979), intermediate vipers were found suggesting also the occurrence of hybrid zones. Moreover, GIS-assisted ecological models could be used to clear evolutionary relationships through the identification of potential hybrid zones among sibling and sympatric species, such as in African and Iberian *Podarcis* lizards (e.g. Pinho *et al.*, 2006).

In summary, environmental factors play an important role in the dynamics of this contact zone affecting the species range. Some factors seem to promote spatial exclusion whereas others endorse the spatial overlap and sympatry. Ecological niche-based models identified the environmental factors that are correlated with the location of the sympatry area and probably act as ecological barriers to interspecific gene flow. Further ecological and genetical data are being collected to evaluate the dynamics of the probable hybrid zone and to establish optimize conservation measures.

Acknowledgments

This study was partially supported by project POCTI/BIA-BDE/55596/2004 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal). FMF was supported by PhD grant (AP2003-2633) from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain) and JCB and NS were supported by Post-doctoral grants (SFRH/BPD/26699/2006 and SFRH/BPD/26666/2006, respectively) from FCT. Authors acknowledge Servicio Transfronterizo de la Universidad de Salamanca and “Asociación Sociocultural Hoces del Alto Ebro y Rudrón” (Burgos, Spain). X Santos, JM Pleguezuelos, MA Carretero and three referees improved earlier versions of the manuscript.

References

- Anderson, R.P., Gómez-Laverde, M. & Peterson, T. (2002) Geographical distributions of spiny pocket mice in South America: insights from predictive models. *Global Ecology & Biogeography*, **11**, 131-141.
- Araújo, M.B. & New, N. (2007) Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**, 42-47.
- Austin, M.P. (1987) Models for the analysis of species' response to environmental gradients. *Vegetatio* **69**, 35-45.
- Barbosa, D., Font, E., Desfilis, E., & Carretero, M.A. (2006) Chemically-mediated species recognition in closely related *Podarcis* wall lizards. *Journal of Chemical Ecology*, **32**, 1587-1598.
- Bea, A. (1985) La repartición de las víboras *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) y *Vipera seoanei* (Lataste, 1879), en el País Vasco. *Ciencias Naturales*, **2**, 7-20.
- Beck, D.D. (1995) Ecology and energetics of three sympatric rattlesnakes species in the Sonoran desert. *Journal of Herpetology*, **29**, 211-223.
- Bishop, A.A., Hoback, W.W., Albrecht, M., & Skinner, K.M. (2002) A comparison of an ecological model and GIS spatial analysis to describe niche partitioning amongst Carrion Beetles in Nebraska. *Transactions in GIS*, **6**, 457-470.
- Brito, J.C. (2003a) Seasonal variation in movements, home range and habitat use by male *Vipera latastei* in northern Portugal. *Journal of Herpetology*, **37**, 155-160.
- Brito, J.C. (2003b) Seasonal and daily activity patterns of *Vipera latastei* in northern Portugal. *Amphibia-Reptilia*, **24**, 497-508.
- Brito, J.C. & Crespo, E.G. (2002) Distributional analysis of two vipers (*Vipera latastei* and *V. seoanei*) in a potential area of sympatry in the North-western Iberian Peninsula. *Biology of the Vipers* (ed. by G.W. Schuett, M. Höggren, M.E. Douglas and H.W. Greene), pp. 129-138. Eagle Mountain Publishing.
- Brown, J.H. & Lomolino, M.V. (1998) *Biogeography*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Duguy, R., Martínez-Rica, J.P. & Saint-Girons, H. (1979) La répartition des vipères dans les Pyrénées et les régions voisines du nord de l'Espagne. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse*, **115**, 359-377.
- Duguy, R. & Saint-Girons, H. (1978) La répartition des vipères et de quelques autres reptiles sur le plateau de Millevaches (Limousin). *Annales de la Société des Sciences Naturelles Charente-Maritime*, **6**, 351-354.
- Elith, J., Graham, C.H., Anderson, R.P., Dudyk, M., Freer, S., Guisan, A., Hijmans, R.J., Huettmann, F., Leathwick, J.R., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, L.G., Loiselle, B.A., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., McOverton, J., Peterson, A.T., Phillips, S., Wisz, M.S. & Zimmermann, N.E. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, **29**, 129-151.
- ESRI (2004) *ArcMap 9.0*. Environmental Systems Research Institute, Inc.

- Garrigues, T., Dauga, C., Ferquel, E., Choumet, V. & Failloux, A.-B. (2005) Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **35**, 35-47.
- GLC (2003) *The Global Land Cover for the Year 2000*. <http://www-gvm.jrc.it/glc2000/defaultGLC2000.htm>
- Guisan, A. & Hofer, U. (2003) Predicting reptile distributions at mesoscale: relation to climate and topography. *Journal of Biogeography*, **30**, 1233-1243.
- Hernandez, P.A., Graham, C.H., Master, L.L. & Albert, D.L. (2006) The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography*, **29**, 773-785.
- Hewitt, G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247-276.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965-1978. <http://www.worldclim.org/>
- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M. & Joger, U. (2001) Evolutionary relationships among the True Vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19**, 94-104.
- Liu, C., Berry, P.M., Dawson, T.P. & Pearson, R.G. (2005) Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography*, **28**, 385-393.
- Luiselli, L.M. (2006) Resource partitioning and interspecific competition in snakes: the search for general geographical and guild patterns. *Oikos*, **114**, 193-211.
- Luiselli, L.M., Angelici, F.M. & Akani, G. (2002) Comparative feeding strategies and dietary plasticity of the sympatric cobras *Naja melanoleuca* and *Naja nigricollis* in three diverging Afrotropical habitats. *Canadian Journal of Zoology*, **80**, 55-63.
- Martínez-Freiría, F., Brito, J.C. & Lizana, M. (2006) Intermediate forms and syntopy among vipers (*V. aspis* and *V. latastei*) in Northern Iberian Peninsula. *Herpetological Bulletin*, **97**, 14-18.
- Monney, J.-C. (1996) *Biologie comparée de Vipera aspis L. et de Vipera berus L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes Bernoises*. PhD thesis. Institute of Zoology, Faculty of Sciences, University of Neuchatel.
- Naulleau, G. (1986) Répartition de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* (Reptilia, Viperidae), dans l'ouest de la France (Loire-Atlantique). *Bulletin de la Société Herpetologique de France*, **39**, 16-19.
- Phillips, S.J., Dudík, M. & Schapire, R.E. (2004) A Maximum Entropy approach to species distribution modeling. *Proceedings of the 21st International Conference on Machine Learning*, pp. 655-662. ACM-Press, New York.

- Pinho, C., Ferrand, N., & Harris, D. J. (2006) Reexamination of the Iberian and North African *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) phylogeny based on increased mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**, 266-273.
- Reinert, H.K. (1984a) Habitat separation between sympatric snake populations. *Ecology*, **65**, 478-486.
- Reinert, H.K. (1984b) Habitat variation within sympatric snake populations. *Ecology*, **65**, 1673-1682.
- Saint-Girons, H. (1975) Coexistence de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un probleme de competition interspecifique. *La Terre et la Vie*, **29**, 590-613.
- Saint-Girons, H. (1980) Biogéographie et évolution des vipères européennes. *Comptes Rendus de la Société de Biogéographie*, **496**, 146-172.
- Santos, X., Brito, J.C., Sillero, N., Pleguezuelos, J.M., Llorente, G.A., Fahd, S. & Parellada, X. (2006) Inferring habitat-suitability areas with ecological modelling techniques and GIS: A contribution to assess the conservation status of *Vipera latastei*. *Biological Conservation*, **130**, 416-425.
- Schluter, D. (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 372-380.
- Shine, R., Reed, R.N., Shetty, S., Lemaster, M.P., & Mason, R.T. (2002) Reproductive isolating mechanisms between two sympatric sibling species of sea snakes. *Evolution*, **56**, 1655-1662.
- SIGA (2005) *Servicio de Información Geográfico Agrario*, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Spain. <http://www.mapya.es/es/sig/pags/siga/intro.htm>
- Swenson, N.G. (2006) GIS-based niche models reveal unifying climatic mechanisms that maintain the location of avian hybrid zones in a North American suture zone. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 717-725.
- Swenson, N.G. & Howard, D.J. (2005) Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. *The American Naturalist*, **166**, 581-591.
- Taberlet, P., Fumaggali, L., Wust-Saucy, A.-G. & Cosson, J.F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- USGS (2004) *Shuttle Radar Topography Mission (SRTM): Mapping the world in 3 dimensions*. United States Geological Survey. <http://srtm.usgs.gov/index.html>.

CHAPTER 4

Patrones geográficos de variación morfológica

Geographical patterns of morphological variation

**Patrones geográficos de variación morfológica y
correlaciones ambientales en las zonas de contacto:
una aproximación multi-escalar usando dos
víboras mediterráneas (Serpentes)**

**Geographical patterns of morphological variation and
environmental correlates in contact zones: a multi-scale
approach using two Mediterranean vipers (Serpentes)**

Fernando Martínez-Freiría, Xavier Santos, Juan M. Pleguezuelos,
Miguel Lizana, José C. Brito.

Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.

Published Online: Mar 19 2009.

DOI: 10.1111/j.1439-0469.2008.00506.x

Patrones geográficos de variación morfológica y correlaciones ambientales en las zonas de contacto: una aproximación multi-escalar usando dos víboras mediterráneas (Serpentes)

Resumen en castellano de

Martínez-Freiría et al. (2009). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2008.00506.x

Introducción

La variación geográfica en los rasgos morfológicos es un fenómeno ubicuo en los todos organismos; los reptiles, como ectotermos dependen mucho de los factores climáticos, lo que los convierte en modelos apropiados para explorar la adaptabilidad morfológica a las condiciones locales.

Se pueden establecer dos hipótesis para explicar la convergencia morfológica entre especies filogenéticamente hermanas en las zonas de contacto: una adaptación a similares presiones selectivas o un proceso de hibridación con intercambio genético entre las especies.

En la península Ibérica existen seis zonas de contacto entre *V. aspis* y *V. latastei* (Fig. 1A y 1B), especies de víboras mediterráneas filogenéticamente cercanas. En dos de estas zonas de contacto, Sierra de la Peña y Alto Ebro, se ha notificado la existencia de simpatria y ejemplares con morfología intermedia entre las dos especies. Además, en el Alto Ebro, el análisis preliminar de 195 ejemplares ha confirmado que la mayoría de las formas intermedias son híbridos entre *V. aspis* y *V. latastei*.

La variación geográfica en la morfología ha sido un tema muy estudiado desde hace mucho tiempo, a través del desarrollo multitud de metodologías para su análisis, y, recientemente, su tratamiento ha sido mejorado con la combinación de la geo-estadística y los SIG. De hecho, los SIG se han revelado como herramientas muy útiles para el análisis de los patrones de variación morfológica y genética, las dinámicas de intercambio genético y la identificación de factores ambientales relacionados con la distribución de las especies en las zonas de contacto.

En este trabajo se testará la hipótesis de una convergencia morfológica entre *V. aspis* y *V. latastei* debida a una adaptación a similares presiones ambientales locales, eliminando para ello las víboras intermedias puesto que pueden ser híbridos y oscurecer los patrones de variación morfológica. Se crearán mapas de variación morfológica usando la geo-estadística y los SIG, y se buscarán correlaciones con los factores ambientales. Los análisis se desarrollarán en dos escalas para analizar patrones y correlaciones independientemente de la escala: regional, incluyendo todas las zonas de contacto entre *V. aspis* y *V. latastei*, y local, en el área de simpatria del Alto Ebro. Los objetivos específicos son las siguientes cuestiones: 1) ¿hay patrones de variación espacial en los rasgos morfológicos para *V. aspis* y *V. latastei*? 2) ¿Pueden identificarse patrones multivariados de variación espacial en la morfología? 3) ¿Existen regiones de transición abrupta en la variabilidad morfológica? 4) ¿Hay variaciones en los rasgos morfológicos correlacionadas con los factores ambientales?

Materiales y métodos

Áreas de estudio

A escala regional, el área de estudio cubre 64.500 km², está localizada en el noreste de la península Ibérica e incluye todas las zonas de contacto conocidas entre *V. aspis* y *V. latastei* (Fig. 1). A escala local, el área de estudio del Alto Ebro cubre 300 km², está localizada en el norte de la península Ibérica e incluye el área de simpatria entre *V. aspis* y *V. latastei* del Alto Ebro (Fig. 1). Ambas regiones se sitúan en la transición de las regiones Eurosiberiana y Mediterránea y presentan una gradación de los factores ambientales como la temperatura o la precipitación.

Las especies

Las especies a estudio son víboras terrestres y vivíparas. *V. aspis* se distribuye por el centro-oeste de Europa, mientras que *V. latastei* lo hace por casi toda la península Ibérica y algunas zonas del norte de África. Difieren morfológicamente y también en cuanto a requerimientos de hábitat pero muestran similitudes en la selección del micro-hábitat, áreas vitales, rasgos reproductivos, técnica de caza y dieta.

Los datos

Se analizaron un total de 728 víboras: 276 ejemplares de colecciones de museo y 452 ejemplares del Alto Ebro. Se utilizó la localización geográfica (en coordenadas UTM) de los especímenes,

ya sea obteniéndolas a través de mapas topográficos (víboras de colecciones) o usando un GPS (víboras del Alto Ebro).

Para cada espécimen se midieron nueve caracteres merísticos: número de escamas ventrales (VENT), subcaudales (SUBCA), apicales (APICA), supralabiales (SUPRAR), infralabiales (INFRAR), perioculares (PERIR), loreales (LORER), intercantales más intersupraoculares (INTER) y marcas dorsales (DMARK).

A escala regional y local VENT y SUBCA presentaron dimorfismo sexual por lo que fueron separados para hembras (VENTF, SUBCAF) y machos (VENTM y SUBCAM). En una fase inicial se aplicó un criterio morfológico (ver capítulo 2) para identificar los especímenes con rasgos intermedios. Los análisis preliminares de variación en los microsatélites confirmaron que los especímenes intermedios eran principalmente híbridos. Por lo tanto, 98 y 92 especímenes a escala regional y local, respectivamente, fueron eliminados de los análisis pero su localización geográfica fue representada en los mapas resultantes.

Procedimientos de modelación

A escala regional se analizaron 630 víboras, 369 *V. aspis* y 261 *V. latastei*. La localización de los especímenes fue representada en el SIG ArcMap 9.2 y los análisis se basaron en celdas UTM 10x10 km, siendo un total de 135 celdas, 99 para *V. aspis* y 41 para *V. latastei* (5 celdas con ejemplares simpátricos) (Fig. 1B). A escala local, se analizaron 362 víboras, 183 *V. aspis* y 179 *V. latastei*. Los especímenes y su localización fueron inscritas en una base de datos geo-referenciada y representados en el SIG ArcMap 9.2 (Fig. 1C), por lo que cada espécimen tuvo una única localización geográfica.

Los siguientes análisis se realizaron independientemente de la clasificación específica. Para ambas escalas, se crearon superficies continuas para cada rasgo morfológico usando la extensión Geostatistical Analyst del ArcMap 9.2, con la función Kriging como método de interpolación. Cada mapa resultante fue reclasificado en intervalos iguales entre sus valores máximos y mínimos.

Para identificar áreas con clinas multivariadas y alta variabilidad morfológica, los mapas resultantes en el paso previo y que mostraron variación espacial fueron exportados al Idrisi Kilimanjaro 14.01 donde se realizó un análisis espacial de componentes principales (SPCA). Luego, se aplicó la función Slope para identificar áreas con grandes cambios (clinas).

Se testó la correlación existente entre los mapas resultantes y 7 factores ambientales (Table 1), descargados en formato digital de Worldclim v 1.4. Las correlaciones fueron estimadas usando la herramienta Band Collection Statistics del Arctoolbox.

Resultados

Escala regional – NE Iberia

Se encontraron clinas marcadas con orientación norte-sur para APICA, DMARK, INTER, VENTF y VENTM (Fig. 2). Estos rasgos morfológicos mostraron un patrón de variación norte-sur al ser analizados a través del SPCA (Fig. 3): bajos valores en el norte, altos en el sur e intermedios con clinas graduales en las zonas de contacto. Se identificaron 3 clinas marcadas de variación morfológica con orientación oeste-este, dividiendo el área en zonas de transición gradual en la variabilidad morfológica (Fig. 3). Además, se identificaron tres correlaciones, así como varias relaciones de tendencia, entre la variación morfológica y ambiental (Table 3).

Escala local – Alto Ebro

Se encontraron clinas marcadas con orientación norte-sur para APICA, DMARK, INTER, VENTF y VENTM (Fig. 4). Estos rasgos morfológicos mostraron un patrón de variación norte-sur al ser analizados a través del SPCA (Fig. 5): bajos valores en el norte, altos en el sur e intermedios con clinas marcadas en la confluencia de los ríos Rudrón y Sedanillo. Se identificaron 3 clinas marcadas de variación morfológica (Fig. 5): una clina norte delimitando un área donde están localizadas la mayoría de las *V. aspis*, una sur separando un área donde sólo existen especímenes de *V. latastei* y una clina en el medio (confluencia Rudrón y Sedanillo) donde se encuentran principalmente los especímenes intermedios. Además, se identificaron siete correlaciones, así como cuatro relaciones de tendencia, entre la variación morfológica y ambiental (Table 3).

Discusión

A pesar de la existencia de estudios morfológicos en las dos especies, no se conocía nada sobre variación morfológica en las zonas de contacto y su relación con los factores ambientales entre *V. aspis* y *V. latastei*. La metodología utilizada en este trabajo ha resultado satisfactoria para analizar zonas de transición morfológica, identificar patrones de variación morfológica y relacionar la morfología y factores ambientales. Los resultados obtenidos a ambas escalas son concordantes, lo que nos permite hacer inferencias independientemente de la escala. Además, los patrones de variación morfológica obtenidos parecen seguir la misma tendencia en el resto de las poblaciones de *V. aspis* y *V. latastei*. No cabe duda que esta metodología podría ser utilizada satisfactoriamente en otras zonas de contacto entre víboras y otros grupos (ej. *Podarcis* ibéricas).

Variación morfológica

Se han observado artefactos en algunos mapas (ej. INTER en NE Iberia) pero éstos se deben a zonas no prospectadas, en el caso del análisis a escala regional, y a la concentración de los especímenes en los valles del Alto Ebro.

En ambas escalas se obtuvo un gradiente norte-sur en la variación morfológica, con marcadas diferencias entre las poblaciones de *V. aspis* del norte y las de *V. latastei* del sur, pero con convergencia morfológica en las zonas de contacto, donde se encuentran los individuos con morfología intermedia. Los patrones observados son los típicos de las zonas de contacto entre especies alopátricas.

Correlaciones entre variación morfológica y factores ambientales

Las correlaciones significativas halladas, sobre todo en el Alto Ebro, entre la variabilidad morfológica de algunos rasgos morfológicos y los factores ambientales sugieren que estos rasgos se encuentran bajo selección y deben responder a adaptaciones a las condiciones ambientales locales. Así, por ejemplo, esto es lo que debe ocurrir con el número de marcas dorsales (correlacionadas con la temperatura y la precipitación) que podría reflejar una adaptación críptica al sustrato. Otro ejemplo, lo constituye el número de escamas ventrales (relacionadas con la precipitación) cuya variación puede estar relacionada con las condiciones climáticas de las diferentes zonas durante el desarrollo embrionario, procesos de intercambio de agua a través de la piel o incluso la habilidad locomotora en un determinado sustrato.

Aunque se han encontrado varias correlaciones entre rasgos morfológicos y factores ambientales, hay rasgos morfológicos no relacionados con factores ambientales (ej. INTER y APICA), por lo que otras presiones selectivas, factores bióticos, procesos de refuerzo o incluso, procesos de intercambio genético pueden jugar un papel muy importante en la variación geográfica en la morfología de estas especies. Como cabría esperar de dos especies ocasionadas por un proceso de especiación alopátrica, los procesos de hibridación deben ocurrir en las zonas de contacto, al igual que ocurre en el Alto Ebro, e interaccionar con la variación fenotípica debida a los factores ambientales.

Conclusiones y futuras investigaciones

El patrón convergente en la variabilidad morfológica encontrado en la zona de contacto de *V. aspis* y *V. latastei* podría ser resultado de presiones selectivas ambientales. Sin embargo, otros factores como presiones bióticas o intercambio genético pueden desempeñar un papel importante. Son necesarios estudios comparativos sobre ecología y genética de ambas especies para identificar un escenario evolutivo para las mismas.

Geographical patterns of morphological variation and environmental correlates in contact zones: a multi-scale approach using two Mediterranean vipers

F. Martínez-Freiría¹, X. Santos^{2,3}, J.M. Pleguezuelos⁴, M. Lizana¹, J.C. Brito⁵

1 - Dep. Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

2 - Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac, Oficina Tècnica de Parcs Naturals, Diputació de Barcelona, c/ Urgell 187, Edif. Rellotge 3^a, 08036 Barcelona, Spain

3 - Dep. Biología Animal, Univ. Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain

4 - Dep. Biología Animal, Univ. Granada, E-18071 Granada, Spain

5 - CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão, R. Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal.

Abstract

Adaptation to similar selective pressures can explain morphological convergence between closely related species in contact zones. Geostatistics and GIS were used to identify multi-scale patterns of morphological variability and test the hypothesis of morphological convergence due to local environmental pressures in the contact areas between *Vipera aspis* and *V. latastei* in the Iberian Peninsula. Nine morphological traits from 630 and 362 vipers at regional and local scale, respectively, were interpolated by Kriging to generate surfaces of morphological variation. Kriging is a geostatistical algorithm that allows investigating the spatial structure of data with statistical models. At both scales, a convergent north-south pattern in morphological variability was observed and the contact areas were identified as integration zones where intermediate vipers are found. Significant correlations were found between surfaces of univariate and multivariate traits, with precipitation and temperature seasonality. Thus, several morphological traits are apparently under local environmental selection. Nevertheless, the influence of biotic pressures and gene flow on morphological convergence of vipers in contact zones deserves further study.

Keywords: adaptation, environmental pressures, geographical variation, geostatistics, GIS, hybridization, Iberian Peninsula, interpolation, morphology, vipers

Introduction

Natural selection is the evolutionary process by which heritable favourable variations due to particular environments are preserved and become more common in successive generations in a population (Darwin 1859). In species with wide distributions, selective pressures can change throughout their ranges and different phenotypes can be favoured as the most efficient forms to exploit local conditions (West-Eberhard 2003). In fact, geographic variation in morphological traits is a ubiquitous phenomenon in organisms and only a very restricted number of species do not show it (Thorpe 1987). There are many examples of how animals have adapted accordingly to selective pressures (Stearns and Hoekstra 2000; Pough et al. 2005). As ectotherms, reptiles are suitable models to explore morphological adaptability to local conditions due to their dependence to climatic variables such as temperature and rainfall (Pough 1980). For instance, temperature can act as a selective factor that leads to the development of different mechanisms along environmental gradients to maintain heat, such as selection for body size in reptiles (Bergmann's rule, Ashton and Feldman 2003), or to prevent water loss, such as increasing-decreasing scale numbers (Malhotra and Thorpe 1997; Sanders et al. 2004). Also predation can lead to mimicry adaptation where different variations in the dorsal colour pattern in agreement with the vegetation cover of the substrate are presumed to reduce predation risk over near-by populations (King 1997).

Contact zones between closely related species are very interesting for studying geographical variations in morphology. Usually they correspond to areas of secondary contact between allopatric species (Brown and Lomolino 1998) where species may experience interspecific gene flow as a result of hybridization (Babik et al. 2005; Beetles et al. 2005) and in many cases exhibit morphological convergence (Arif et al. 2007; Gifford 2008). Two main hypotheses can be drawn to explain morphological convergence between closely related species in contact zones: adaptation to similar selective pressures, including biotic and abiotic factors, or hybridization processes with genetic exchange between species. The former can be tested by experimental analyses (e.g. Blanckenhorn and Demont 2004) or alternatively by examining correlations between selective pressures and morphological variation (e.g. Báez and Brown 1997), whereas the latter can be tested by molecular studies.

In the Iberian Peninsula there are three parapatric viper species, two sibling Mediterranean, *V. aspis* and *V. latastei*, and one phylogenetically distant Euro-Siberian, *V. seoanei* (Lenk et al. 2001; Garrigues et al. 2005), which have several contact zones along their distribution areas (Fig. 1A). An allopatric distribution pattern at regional scale (10x10 km cells) is found for the phylogenetically distantly-related pairs, *aspis-seoanei* and *latastei-seoanei*, but sympatry was suggested for the closely-related *aspis-latastei* in six areas of the Iberian Peninsula (Fig. 1B): one in northern

Iberian System, four in southern Pyrenees (Sierra de la Peña, Sobrarbe, Pallars, Moianés) and one in the high course of Ebro river (Pleguezuelos et al. 2002). No data are available for the Iberian System and the southern Pyrenees are poorly known with the exception of Sierra de la Peña, where a wide contact zone with populations in apparent sympatry was reported along a 10 km west-east band (Duguy et al. 1979). In the high course of Ebro river (hereafter High Ebro), sympatry was observed in an area of 8 km² (Fig. 1C) along the middle course of the rivers Rudrón and Sedanillo (Martínez-Freiría et al. 2006) and ecological niche modelling techniques identified an area of 76 km² where *V. aspis* and *V. latastei* could potentially be found together (Martínez-Freiría et al. 2008). Interestingly, specimens with intermediate morphological characteristics (similar scale counts and colour pattern) were found in Sierra de la Peña and High Ebro (Duguy et al. 1979; Martínez-Freiría et al. 2006). Moreover, preliminary analyses of microsatellite variation in 195 specimens from High Ebro revealed the existence of gene flow among both species and that morphologically intermediate vipers correspond mostly to hybrids (Brito JC, Godinho R, Martínez-Freiría F, Tarroso, P, unpub. data).

Geographic variation in morphology has taken much importance since the latest decades of past century (Thorpe 1987 and references therein). Traditionally, multivariate analysis using discrete tools as Principal Component Analysis (PCA) or Canonical Variate Analysis (CVA) are used to identify geographical patterns of variation in morphological traits allowing the proposal of ecological and evolutionary hypotheses (e.g. Thorpe 1984; Wüster and Thorpe 1989). Later, these tools were combined with interpolation algorithms allowing the production of continuous surfaces of morphological variation (e.g. Thorpe and Báez 1987; Báez and Brown 1997) and therefore, enlightening geostatistical approaches as powerful tools for analysing geographic patterns of variation in morphological characters. Recently, the combination of geostatistics with Geographical Information Systems (GIS) has resurrected the importance of geography in morphology (Kidd and Ritchie 2000; Swenson 2008). In fact, GIS are useful tools to analyse geographic patterns of morphological and genetical variation (Cesaroni et al. 1997; Kidd and Ritchie 2000; Brito et al. in press), the dynamics of gene flow (Spear et al. 2005) and the identification of environmental factors related to species distribution in contact zones (Swenson 2006, 2008; Martínez-Freiría et al. 2008).

Knowing that gene flow exists among *V. aspis* and *V. latastei* (authors, unpub. data), in this work it will be tested the hypothesis of morphological convergence between both species due to an adaptation to similar local environmental pressures. Geostatistics and GIS tools will be used to derive spatially explicit maps of the patterns of geographic variation in external morphological traits along the contact area. Adaptation to local environmental pressures will be tested by exploring

spatial correlations between morphological patterns and abiotic environmental pressures. Intermediate vipers will not be used in the analysis because they are mostly hybrids, thus obscuring patterns of morphological variation and their interaction with the environment. Analyses will be conducted at two complementary scales in order to analyse patterns and correlations independently of scale: regional, including all known contact areas in North-eastern Iberia, and local, focusing the analysis on the sympatry area of High Ebro. Therefore, the aims of this study are focused on the following questions: 1) are there patterns of spatial variation in particular morphological traits for *V. latastei* and *V. aspis* in contact zones? 2) Can multivariate patterns of spatial variation in morphology be identified? 3) Are there regions of sharp transition in morphological variability? 4) Are morphological trait variations correlated with abiotic factors?

Fig. 1 A) Distribution of Iberian vipers and geographic location of the study areas in the Iberian Peninsula (adapted from Pleguezuelos et al., 2002; Brito et al., 2006). B) Study area of NE Iberia with the location of 10x10 km UTM cells with specimens of *Vipera aspis*, *V. latastei* and intermediate forms, and geographic location of the contact zones between *V. aspis* and *V. latastei*. C) Study area of High Ebro with the GPS locations of specimens of *V. aspis*, *V. latastei* and intermediate forms.

Materials and Methods

Study areas

At regional scale, the study area covers 64500 km² and it is located in the north-east of Iberian Peninsula, and includes all known contact zones between *V. aspis* and *V. latastei* (Fig. 1). It is limited to the north by the Pyrenees chain and Bask Mountains, and to the south by the Ebro

Valley to the west to by the High Ebro and the Iberian System, and to the east by the Mediterranean Sea. Altitude ranges from 0 to 3404 m a.s.l., average annual precipitation from 438 to 1759 mm/year, and average temperature from 19.9 to 30.0°C (Hijmans et al. 2005). The area coincides with the transition between the Euro-Siberian and Mediterranean regions.

At local scale, the study area of High Ebro covers 300 km² and includes the sympatry area between *V. aspis* and *V. latastei* on the high course of the Ebro River (Fig. 1). This area also matches with the transition between Euro-Siberian and Mediterranean regions, consisting of flat plateaus with deep valleys excavated by the Ebro River and its tributaries, Rudrón and Sedanillo rivers. Altitude ranges from 621 to 1150 m a.s.l., average annual precipitation from 697 to 829 mm/year, and average annual temperature from 22.2 to 24.8°C (Hijmans et al. 2005).

The Species

Case species are terrestrial viviparous old world vipers (Serpentes, Viperinae). *V. aspis* occurs in central-western Europe whereas *V. latastei* is restricted to almost all Iberian Peninsula, but with isolated populations in the Maghreb (Pleguezuelos et al. 2002). Morphologically, both species differ in the elevation of snout, number of apical scales, number of dorsal marks and dorsal coloration pattern (see morphological criteria below). Habitat requirements are generally different between species but can overlap, allowing sympatry in contact zones such as High Ebro: *V. aspis* occurring in steeper areas at lower altitude, with moderate levels of precipitation, high levels of evapotranspiration and needle-leaved and evergreen forests whereas *V. latastei* also occurring in steeper but warmer areas, with low levels of precipitation and moderate levels of evapotranspiration (Martínez-Freiría et al. 2008). In High Ebro, both species select rocky areas with bushes during most of the year, but during summer, *V. aspis* selects warmer micro-habitats than *V. latastei* (authors, unpub. data). Home-range size is small in both species throughout most of the year, but males increase it during the mating season (Moser et al. 1984; Brito 2003a). Mating can occurs in spring or autumn and births take place in middle or late summer (Lourdais et al. 2004; Pleguezuelos et al. 2007). Both vipers are ambush predators, taking mostly lizards as juveniles and micro-mammals as adults (Bea et al. 1992; Santos et al. 2007).

The Data

A total of 728 vipers, 276 preserved specimens from museum collections and 452 live specimens from High Ebro were analysed (List S1). Preserved specimens came from the following institutions: Sociedad de Ciencias Aranzadi (Donostia), Instituto Pirenaico de Ecología, CSIC (Jaca), Departament de Biologia Animal, Barcelona University (Barcelona), Estación Biológica de

Doñana, CSIC (Seville), Museu de Ciències Naturals of Barcelona (Barcelona), Monestir de Montserrat (Barcelona), Laboratoire de Biogéographie et Écologie des Vertébrés, Université de Montpellier II (Montpellier), Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC (Madrid) and Departamento de Biología Animal, Salamanca University (Salamanca). The geographic location of the specimens was determined on the Universal Transverse Mercator Projection (UTM). UTM coordinates were gathered manually from map series (1:250 000 from Mapa Militar Digital de España v1.5). Specimens from High Ebro came from visual encounter surveys based in 1x1 km UTM squares and road sampling between March 2004 and August 2007. They were captured by hand and their geographic location (UTM coordinates, WGS84 datum) recorded with a Global Positioning System (GPS) with a location error less than 8 m.

For each specimen, nine meristic characters were recorded: number of ventral scales, excluding precentrals and anal, following the method used by Saint-Girons (1978) (VENT); subcaudal scales (SUBCA); apical scales (APICA); supralabial scales (SUPRAR); infralabial scales (INFRAR); periocular scales (PERIR); loreal scales (LORER); intercantal plus intersupraocular scales (INTER); and dorsal marks (DMARK). When bilateral, characters were considered on the right side of the head. These characters were selected because they were reported to present variation across geographic ranges of the two vipers in previous morphological analyses (Zuffi 2002; Brito et al. 2006).

As European vipers were reported to be dimorphic (Saint Girons 1978), morphological traits were tested for sexual dimorphism. At regional and local scales VENT and SUBCA presented significant sexual dimorphism in number (Kruskal Wallis test, $p < 0.001$), thus they were analysed separately for females (VENTF, SUBCAF) and males (VENTM, SUBCAM). In an initial stage, specimens were classified into putative species in order to identify individuals with intermediate traits. Criteria for classification included the combination of the following morphological characters (for details see Martínez-Freiría et al. 2006): 1) snout elevation and number of apical scales: snout slightly upwards with two to three apical scales in *V. aspis* and snout upwards, forming an appendix with three to nine apical scales in *V. latastei*; 2) shape of the dorsal stripe: alternated cross bands with a thin vertebral line (type 0) or narrow angular zigzag (type 1) in *V. aspis*, and wide zigzag (type 2) or rounded-rhomboidal marks running together to form a wavy or zigzag stripe (type 3) in *V. latastei*; 3) number of dorsal marks: 45 to 78 in *V. aspis* and 33 to 57 in *V. latastei*. Preliminary analyses of microsatellite variation corroborated this morphological classification between true and intermediate forms, i.e. specimens exhibiting intermediate morphological traits between both species corresponded mostly to hybrids (authors, unpub. data). Thus, intermediate vipers, 98 specimens at the regional scale and 92 at the local scale, were removed from the

following analyses but their geographic location was displayed in the resulting maps.

Modelling procedures

For the regional scale, NE Iberia, a total of 630 vipers, 369 *V. aspis* and 261 *V. latastei*, were analysed. The locations of specimens were displayed in the Geographical Information System (GIS) ArcMap 9.2 (ESRI 2006) on the WGS84 datum (Fig. 1B). Modelling analyses were based in 10x10 km UTM cells using the coordinates for the centroids of each grid cell (X and Y central coordinates). A total of 135 10x10 km UTM cells, 99 for *V. aspis* and 41 for *V. latastei*, were used in the regional scale analyses, with five grid cells presenting sympatry between both vipers. For the local scale, High Ebro, a total of 362 vipers, 183 *V. aspis* and 179 *V. latastei*, were analysed. Specimens and their locations were inscribed in a georeferenced database and also were displayed in the GIS ArcMap 9.2 on the WGS84 datum (Fig. 1C). Modelling analyses were based on GPS locations, thus each specimen had a unique location.

Although all specimens were classified into putative species in order to detect and remove intermediate vipers, the following analyses were performed independently of species classification. For both NE Iberia and High Ebro and for each morphological trait, a continuous surface was created with ArcMap 9.2, using the Geostatistical Analyst extension (Johnston et al. 2001). A Kriging function was used as an interpolation method, using weights from a semivariogram estimated through the spatial structure of the data (Oliver 1990). The Kriging function creates continuous surfaces of morphological variability by interpolating the values of each trait from the sampled locations (Kidd and Ritchie 2000; Brito et al. in press). This procedure is useful because not all morphological traits were available for all grid cells sampled (Fig. 1), and many specimens were found dead on the road, partially damaged. For the five 10x10 UTM cells at the regional scale where sympatry between putative species was found, the coordinates of the centroids were dislocated 10 metres for each of the specimens to avoid their spatial overlap. A number of statistical measures can be used to assess the performance of the Kriging interpolation (Tables S2, S3). For a model that provides accurate predictions, the mean error should be close to 0, the root-mean-square error and average standard error should be as small as possible, and the root-mean-square standardized error should be close to 1 (for details see Johnston et al. 2001). Each trait map was reclassified into equal intervals between their respective maximum and minimum values for the morphological character. The reclassified surfaces were overlaid with a Boolean mask to remove areas without sampled locations.

In order to identify areas with multivariate clines and high morphological variability, continuous morphological trait surfaces derived in the previous step were exported to Idrisi Kilimanjaro

14.01 (Clark Labs 2003) and a Spatial Principal Components Analysis (SPCA) was undertaken. The greatest advantage of PCA is that it finds structural relationships among specimens without *a priori* subdivision into discrete groups (Thorpe 1984). The SPCA maps were created using the PCA function from Idrisi Kilimanjaro 14.01, which produced a new set of uncorrelated images, principal components (PC) maps, which explain progressively the reduced variation found in the original set of surface trait maps. PC maps were derived using only traits with meaningful spatial variation as determined by an exploratory analysis of the individual trait surfaces (Brito et al. in press). Thus, homogeneous surface traits, i.e. without spatial variation, were discarded. Trait surfaces were unstandardized and used variance/covariance matrixes, implying that the surface trait maps with a greater morphological variance had greater loading scores in the SPCA (Kidd and Ritchie 2000; Brito et al. in press). For each PC map, the loading scores were used as a measure of the association between surface trait maps and the total variance accounting for each eigenvalue was used to evaluate the level of explanation of the analysis. Then, the Slope function was applied to the PC maps in Idrisi GIS in order to highlight areas of great changes (clines) in the PC surfaces, i.e. the regions of sharp transition in morphological variability. Finally, PC and slope maps were exported to ArcMap 9.2 for enhanced display.

Table 1 Environmental factors tested for correlation with geographic variation in morphological traits of *V. aspis* and *V. latastei* in NE Iberia and High Ebro.

Code	Variable	Range and units for NE Iberia	Range and units for High Ebro
ALT	Altitude	From 0 to 3252 m a.s.l.	From 621 to 1150 m a.s.l.
PREC	Annual average precipitation	From 438 to 1759 mm/year	From 697 to 829 mm/year
PRECS	Precipitation seasonality	From 11 to 35 mm	From 20 to 23 mm
TEMP	Annual average temperature	From 19.9 to 30.0 °C	From 22.2 to 24.5 °C
TEMPS	Temperature seasonality	From 4.5 to 6.5 °C.	From 4.8 to 5.3 °C
MINT	Minimum temperature of the coldest month	From -12.3 to 6.8 °C	From -1.3 to 1.7 °C
MAXT	Maximum temperature of the warmest month	From 9.2 to 30.7 °C	From 22.7 to 24.5 °C

Surface trait and PC maps were tested for correlation at both scales with a set of seven environmental factors including topographical and climatic factors (Table 1). These environmental variables are known to affect the distribution of *V. aspis* and *V. latastei*, and could be related to geographic variation in morphology (Brito and Crespo 2002; Santos et al. 2006; Martínez-Freiría et al. 2008). Environmental variables with a spatial resolution of approximately 1 km² were downloaded in digital format from Worldclim v1.4 (Hijmans et al. 2005). Correlations were estimated using the Band Collection Statistics tool of Arctoolbox (ESRI 2006).

Results

Regional scale – NE Iberia

The continuous surfaces obtained for INFRAR, LORER, PERIR, SUBCAF, SUBCAM and SUPRAR did not display spatial variation thus, they were removed from subsequent analysis. Marked

Fig. 2 Spatial variation patterns of morphological traits from *Vipera aspis* and *V. latastei* in NE Iberia. Continuous surfaces were derived using Kriging interpolation algorithm (see the Methods section for details). APICA - number of total apical scales; DMARK - number of dorsal marks; INTER - number of intercantal plus intersupraocular scales; VENTF - number of ventral scales for females; VENTM - number of ventral scales for males. Each symbol in the map represents a UTM 10x10km cell for which specimens with morphological data were available.

clines with a general north–south orientation were found for APICA, DMARK, INTER, VENTF and VENTM (Fig. 2). The variance accounted for the two most explicative dimensions, PC1 and PC2, on the SPCA were 84.66% and 8.62%, respectively. All traits explained a significant amount of variation on the PC1 axis (Table 2) and a north–south pattern of variation was observed in PC1 (Fig. 3): low values in northern areas (north and northeast of Sierra de la Peña and Sobrarbe), high values in southern areas (south of Iberian System and Moianés), and intermediate values with gradual clines along the contact zones. Three steep continuous clines and several discontinuous clines of morphological variation were identified (Fig. 3), mainly running from west to east and dividing the study area into zones of gradual transition in morphological variability. The overlay of localities of specimens on the PC1 and slope maps allows the visualization of patterns of convergence in morphological variability but at different levels: western (High Ebro, Iberian System) and eastern (Moianés) contact zones are more related to *V. latastei* morphological variability, whereas central contact zones (Sierra de la Peña) are more related to *V. aspis* variability (Fig. 3).

Table 2 Loading scores on the first two principal components extracted according to the Spatial Principal Components (PC) Analysis of individual surfaces of variation of morphological traits from *Vipera aspis* and *V. latastei* in NE Iberia and High Ebro and percentage of variance explained by the first two principal components.

TRAIT	Regional scale: NE Iberia		Local scale: High Ebro	
	PC1	PC2	PC1	PC2
APICA	-0.927	0.084	-0.973	-0.064
DMARK	0.966	-0.036	0.971	0.064
INTER	-0.947	0.337	-0.919	-0.061
VENTF	0.796	0.570	0.904	0.390
VENTM	0.934	0.106	0.926	-0.364
% variance	84.660	8.620	89.610	5.360

Only three significant correlations between morphological and environmental variation were found (Table 3): positive between the VENTM and PC1 with PREC, and negative between VENTM and PRECS. Nevertheless, there was also a trend for a positive relationship between DMARK and VENTF with PREC, and between INTER and TEMPS, and a trend for a negative relationship between APICA and PREC, and between VENTM and MAXT (Table 3).

Local scale – High Ebro

The surfaces obtained for SUPRAR, INFRAR, PERIR, LORER, SUBCAM and SUBCAF did not display spatial variation and were removed from further analysis. Marked clines with a north–south orientation were found for APICA, DMARK, INTER, VENTF and VENTM (Fig. 4). The variance accounted for PC1 and PC2 were 89.61% and 5.36%, respectively and all traits explained a significant amount of variation in PC1 (Table 2). A clear north–south pattern of gradual variation

Fig. 3 Spatial principal component map (PC1) and clines of steep transition (SLOPE) for morphological variability of *Vipera aspis* and *V. latastei* in NE Iberia. Each symbol in the map represents a UTM 10x10km cell for which specimens with morphological data were available.

Table 3 Correlations between environmental factors and morphological trait surfaces and morphological variability (PC1) of *Vipera aspis* and *V. latastei* in NE Iberia and High Ebro. Correlations above 0.750 (*) identify environmental factors related to morphological variation. (See Materials and Methods and Table 1 for variable explanation).

SCALE	TRAIT	ALT	PREC	PRECS	TEMP	TEMPS	MINT	MAXT
Regional: NE Iberia	APICA	-0.176	-0.722	0.486	0.572	0.555	0.151	0.516
	DMARK	0.358	0.734	-0.698	-0.441	-0.528	-0.386	-0.629
	INTER	-0.136	-0.655	0.493	0.535	0.718	0.144	0.484
	VENTF	0.363	0.708	-0.595	-0.336	-0.225	-0.437	-0.602
	VENTM	0.501	0.757*	-0.766*	-0.368	-0.459	-0.544	-0.716
	PC1	0.329	0.789*	-0.667	-0.509	-0.568	-0.354	-0.647
Local: High Ebro	APICA	0.195	-0.734	-0.172	0.709	0.762*	-0.307	0.487
	DMARK	-0.219	0.762*	0.187	-0.753*	-0.803*	0.337	-0.499
	INTER	0.097	-0.676	-0.096	0.573	0.631	-0.196	0.483
	VENTF	-0.145	0.605	0.125	-0.552	-0.649	0.227	-0.400
	VENTM	-0.111	0.795*	0.091	-0.689	-0.700	0.239	-0.576
	PC1	-0.173	0.775*	0.150	-0.720	-0.770*	0.291	-0.529

was observed in PC1 (Fig. 5): low values in northern areas (near of Ebro river and La Lora plateau), high values in southern areas (Masa plateau), and intermediate values with steep clines in the confluence of Rudrón and Sedanillo rivers. Three steep continuous clines of morphological variation were displayed (Fig. 5): a northern cline delimiting an area where most *V. aspis* specimens were found, a southern cline separating an area where only *V. latastei* specimens were found, and a middle cline in the confluence of Rudrón and Sedanillo rivers, where intermediate vipers were mostly located.

Fig. 4 Spatial variation patterns of morphological traits from *Vipera aspis* and *V. latastei* in the High Ebro. Continuous surfaces were derived using Kriging interpolation algorithm (see the Methods section for details). APICA - number of total apical scales; DMARK - number of dorsal marks; INTER - number of intercantal plus intersupraocular scales; VENTF - number of ventral scales for females; VENTM - number of ventral scales for males. Each symbol in the map represents a GPS location for which specimens with morphological data were available.

Significant positive correlations were found between DMARK and VENTM with PREC, and between APICA and PC1 with TEMPS (Table 3). Significant negative correlations were found between PC1 and PREC, and between DMARK with TEMP and TEMPS. There was also a trend for a positive relationship between APICA and PC1 with TEMP and a trend for negative relationship between APICA and PREC, and between VENTM and TEMPS.

Discussion

Morphological traits of *V. aspis* and *V. latastei* have been studied in discrete populations (e.g. Zuffi 2002; Brito et al. 2006; Golay et al. 2008) or using continuous surfaces derived from geostatistics (only *V. latastei*: Brito et al. in press). Nevertheless, nothing was known about morphological variation in their contact zones and the relationship between geographical variation and environmental pressures. The combination of GIS and geostatistics proved to be a powerful tool capable of analysing morphological transition zones, identifying morphological variation patterns and establishing links between morphology and environmental factors. Moreover, in our case study, results from local and regional scales are mostly concordant, enabling the draw of scale independent inferences. For instance, the major variation patterns found in this study follow the same geographic trends for *V. latastei* in the remaining distribution area (Brilo et al. in press). Although continuous surfaces of morphological variation covering the entire range of *V. aspis* are not available, northern populations (France) belonging to the subspecies *V. a. aspis* (Zuffi 2002; Trutnau et al. 2005) also follow the same geographic trends reported in the present study. These techniques could be used to analyse other contact zones between European viper species, such as between *V. berus* and *V. aspis* in the Atlantic Loire of France (Saint-Girons 1975), between *V. ammodytes* subspecies in the Balkans (Tomović 2006), or even between complex groups such as Iberian *Podarcis* lizards (Pinho et al. 2007).

Morphological variation

Artefacts in surface trait maps are relatively common (Kidd and Ritchie 2000; Brito et al. in press) and a few concave and fanning out cross-hatching artefacts can be observed in areas without sampled localities in the surface for INTER in NE Iberia and in several trait surfaces in High Ebro. Sampled localities in NE Iberia are roughly distributed evenly whereas in High Ebro, morphological data is concentrated along the river valleys and mostly absent from plateaus (Fig. 1). This is a consequence of the distribution of vipers at a local scale, which tend to be absent from the windy and well-exposed plateaus (Martínez-Freiría et al. 2006, 2008). Despite the presence of artefacts in some individual surface trait maps, general patterns of morphological variation can be identified and tested for correlation with environmental factors.

Fig. 5 Spatial Principal Component map (PC1) and clines of steep transition (SLOPE) for morphological variability of *Vipera aspis* and *V. latastei* in the High Ebro. Each symbol in the map represents a GPS location for which specimens with morphological data were available.

In both NE Iberia and High Ebro, there is a north-south gradual gradient in morphological variation. There are marked morphological differences between the populations of *V. aspis* in the north and of *V. latastei* in the south, but both species exhibit morphological convergence in the contact areas, precisely where intermediate vipers are found. At the regional scale, there is a sharp transition in morphological variability, but areas of integration and convergence are identified in almost all contact zones, such as the case of the High Ebro, where *V. aspis*, *V. latastei* and intermediate vipers are present. These patterns of morphological variation are typical of secondary contact zones between allopatric forms, where a rapid transition area with steep clines of morphological variation between relatively stable geographic forms can be recognised (Thorpe 1987).

Correlates between morphological variation and environmental factors

The current study identified significant correlations, mostly in High Ebro, between morphological variability of some traits and environmental factors. This finding suggests that some morphological traits are under selection and may display adaptations to local environmental conditions. For instance, the number of dorsal marks is positively related to precipitation and negatively related to temperature and temperature seasonality at local scale, exhibiting larger numbers in northern areas. Accordingly, geographic variation in the number of dorsal marks of *V. latastei* in the remaining Iberia and North Africa follows the trend of decreasing number of marks with latitude

(Brito et al. in press). Variations in the dorsal pattern of European vipers could reflect mimicry or cryptic adaptation of snakes to the substrate (Saint-Girons 1980; Nikasnen and Mappes 2005), because vipers are terrestrial snakes with sedentary behaviour and individuals tend to remain inside bushes through the year (e.g. Brito 2003a,b). Therefore, vipers with a higher number of dorsal marks may camouflage more efficiently in habitats with denser vegetation, in comparison with vipers with a lower number of dorsal marks, which camouflage better in areas of sparse vegetation. Precipitation is one of the main factors that influences vegetation (Costa et al. 1996) and could act as a surrogate for the amount of vegetation covering the substrate. Northern localities, with Atlantic climate and high levels of precipitation, usually present denser vegetation than southern localities, with Mediterranean climate and reduced precipitation (Fig. S4). In fact, populations from northern areas belonging to *V. aspis*, especially at the local scale, presented higher number of dorsal marks, which should be related to higher precipitation levels resulting in dense vegetation cover. Intermediate vipers are found in areas of climate transition, i.e. in areas with intermediate levels of precipitation and probably vegetation cover (Fig. S4).

The number of ventral scales is positively related to precipitation at both scales and negatively related to precipitation seasonality at the regional scale, exhibiting larger numbers in northern areas. Moreover, there is a trend for a negative relationship between number of ventral scales and maximum temperature at regional scale and temperature seasonality at local scale, the later being higher in southern areas (Fig. S4). As with number of dorsal marks, the variation in the number of ventral scales of *V. latastei* in the remaining Iberia and North Africa follows the same pattern (Brito et al. in press). The number of ventral scales is related to number of vertebrae in European vipers (Saint-Girons 1978, 1980). Both vertebrae and ventral scales are linked by connective tissue and muscles and they form an interactive unit that is responsible for locomotion (Cundall 1987). Variation in the number of vertebrae-ventral scales could be related to climatic conditions during embryonic development since they can exert profound and long-term effects on many types of organisms. Although viviparity in ectotherms allows the reproducing female to buffer ambient thermal variation for her developing offspring, even an actively thermoregulating female may be unable to provide optimal incubation regimes in severe weather conditions (Lourdais et al. 2004). Many ectotherms have a negative relationship between developmental temperature and vertebral number (e.g in fishes, Fahy 1972, or in salamanders, Peabody and Brodie 1975), but snakes have been reported to follow the opposite trend (Fox 1948; Lindell 1994). In fact, warmer temperatures during gestation were demonstrated to increase ventral scale counts in *V. aspis* neonates (Lourdais et al. 2004). Other selective pressures, such as water exchange processes across the skin (Sanders et al. 2004) or locomotor performance through a given substrate (Kelley et al. 1997) were reported

to affect the number of ventral scales in snakes: higher numbers in drier and open habitats, respectively. However, *V. aspis* and *V. latastei* follow again an opposite trend, exhibiting lower number of ventrals in drier and open habitats. Thus, phylogenetical relationships should also be related to the complex pattern of variation observed.

At both scales, geographic variation in morphological variability of vipers and their morphological convergence in contact zones seem to be an adaptation to environmental selective pressures, such as precipitation and temperature. Nevertheless, correlations with other environmental factors are generally weak ($r < 0.700$ in most cases) and several morphological traits with spatial meaning, such as number of intercantals plus intersupraoculars and apicals, are not related to the examined environmental factors. Thus, other selective environmental pressures not afforded in our study, biotic factors, reinforcement, or even gene flow processes, may be also playing an important role in the geographic variation of both species. However, low growth rates, delayed sexual maturation and low reproductive frequency of Iberian vipers combined with general rareness and conservation status (Pleguezuelos et al. 2002; Santos et al. 2006) hamper the development of experimental studies enlightening biological responses of different phenotypes to environmental pressures. Attending to the common evolutionary history of these species it can be perceived the importance of gene flow and hybridization. *Vipera aspis* and *V. latastei* are Mediterranean species that evolved from a common ancestor in Western Europe in early Miocene and probably suffered allopatric speciation during under a probable allopatric speciation process during the Pleistocene ice ages of the Quaternary (Lenk et al. 2001; Szyndlar and Rage 2002; Garrigues et al. 2005). Consequently, their current distributions are mainly parapatric and sympatry is almost non-existent (Saint-Girons 1980). Thus, hybridization could be expected when populations from both species meet in secondary contact. In fact, gene flow occurs in the sympatry area of High Ebro (authors, unpub. data). Also, the analysis of geographic variation of 10 morphological traits of *V. latastei* with geostatistics in the Iberian peninsula and North Africa, demonstrated that populations from NE Iberia have a high level of morphological differentiation and could be the result of intro-gression with *V. aspis* (Brito et al. in press). Thus, where environmental factors allow contact between *V. aspis* and *V. latastei*, hybridisation and interspecific gene flow occur and interact with phenotypic variation due to environmental pressures.

Conclusions and future research

In summary, the current study identified a convergent north-south pattern in morphological variability in *V. aspis* and *V. latastei* in their contact area in the Iberian Peninsula. Correlations between geographic patterns in morphological traits with abiotic environmental selective pressures

were found, suggesting that these patterns could result from local environmental selective pressures. Nevertheless, environmental factors seem to act over particular traits whereas other factors such as biotic pressures or gene flow could be also responsible for morphological variability and convergence between these species. Comparative studies on the ecology of both species, allowing the test of interspecific competition, and genetic studies, allowing the quantification of interbreeding and gene flow, are needed to draw evolutionary scenarios for these vipers.

Acknowledgements

Authors acknowledge the Institutions and personal that allowed the measurement of specimens: Sociedad de Ciencias Aranzadi (Donostia), Instituto Pirenaico de Ecología (Jaca), Departament de Biologia Animal, Barcelona University (Barcelona), Estación Biológica de Doñana (Seville), Museu de Ciències Naturals of Barcelona (Barcelona), Monestir de Montserrat (Barcelona), Laboratoire de Biogéographie et Écologie des Vertébrés, Université de Montpellier II (Montpellier), Museo Nacional de Ciencias Naturales (Madrid) and Departamento de Biología Animal, Salamanca University (Salamanca). This study was partially supported by project POCTI/BIA-BDE/55596/2004 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal). FMF was supported by a PhD grant (AP2003-2633) from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain), JCB by a Post-doctoral grant (SFRH/BPD/26699/2006) from FCT and XS by a Beatriu de Pinós Post-doctoral grant (BP B1-10211) from Generalitat de Catalunya (Spain). Authors acknowledge “Asociación Sociocultural Hoces del Alto Ebro y Rudrón” (Burgos, Spain) and also friends who helped with the field work in the High Ebro.

Resumen

Patrones geográficos de variación morfológica y correlaciones ambientales en zonas de contacto: una aproximación multi-escalar usando dos víboras mediterráneas

La adaptación a presiones selectivas similares puede explicar la convergencia morfológica entre especies cercanas en las zonas de contacto. Se han usado la Geostatística y los SIG tanto para identificar a patrones multi-escalares en la variabilidad morfológica como para testar la hipótesis de una convergencia morfológica debido a presiones ambientales locales en las zonas de contacto entre *Vipera aspis* y *V. latastei* en la Península Ibérica. Nueve rasgos morfológicos de 630 y 362 víboras a escala regional y local, respectivamente, han sido interpolados por Kriging para generar superficies de variación morfológica. Kriging es un algoritmo geostatístico que permite investigar la estructura de los datos a través de modelos estadísticos. A ambas escalas se han observado patrones convergentes con dirección norte-sur en la variabilidad morfológica y las zonas de contacto han sido identificadas como zonas de integración donde se encuentran víboras con caracteres morfológicos intermedios. Se han hallado correlaciones significativas entre las superficies univariadas y multivariadas con la precipitación y la temperatura estacional. Por lo tanto, varios rasgos morfológicos están aparentemente bajo selección ambiental local. Sin embargo, la influencia de presiones bióticas y flujo genético en la convergencia morfológica de las víboras en las zonas de contacto necesita estudios adicionales.

References

- Arif S, Adams DC, Wicknick JA (2007) Bioclimatic modelling, morphology, and behaviour reveal alternative mechanisms regulating the distributions of two parapatric salamander species. *Evol Ecol Res* **9**: 843-854.
- Ashton KG, Feldman CR (2003) Bergmann's rule in nonavian reptiles: turtles follow it, lizards and snakes reverse it. *Evolution* **57**: 1151-1163.
- Babik W, Branicki W, Crnobrnja-Isailović J, Cogalniceanu D, Sas I, Olgun K, Poyarkov NA, García-París M, Arntzen JW (2005) Phylogeography of two European newt species - discordance between mtDNA and morphology. *Mol Ecol* **14**: 2475-2491.
- Báez M, Brown RP (1997) Testing multivariate patterns of within-island differentiation in *Podarcis dugesii* from Madeira. *J Evol Biol* **10**: 575-587.
- Bea A, Braña F, Baron JP, Saint-Girons H (1992) Régimes et cycles alimentaires des vipères européennes (Reptilia, Viperidae). *Année Biologique* **31**: 25-44.
- Beetles CM, Docker MF, Dufour B, Heath, DD (2005) Hybridization dynamics between sympatric species of trout: loss of reproductive isolation. *J Evol Biol* **18**: 1220-1233.
- Blanckenhorn W U, Demont M (2004) Bergmann and Converse Bergmann Latitudinal Clines in Arthropods: Two Ends of a Continuum? *Integr Comp Biol* **44**: 44:413-424
- Brito JC (2003a) Seasonal variation in movements, home range and habitat use by male *Vipera latastei* in northern Portugal. *J Herpetol* **37**: 155-160.
- Brito JC (2003b) Seasonal and daily activity patterns of *Vipera latastei* in northern Portugal. *Amphibia-Reptilia* **24**: 497-508.
- Brito JC, Crespo EG (2002) Distributional analysis of two vipers (*Vipera latastei* and *V. seoanei*) in a potential area of sympatry in the North-western Iberian Peninsula. In: Schuett GW, Höggren M, Douglas ME, Greene HW (eds), *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Utah, pp 129-138.
- Brito JC, Santos X, Pleguezuelos JM, Fahd S, Llorente GA, Parellada X (2006) Morphological variability of the Lataste's viper (*Vipera latastei*) and the Atlas dwarf viper (*Vipera monticola*): patterns of biogeographical distribution and taxonomy. *Amphibia-Reptilia* **27**: 219-240.
- Brito JC, Santos X, Pleguezuelos JM, Sillero N (2008) Inferring evolutionary scenarios with geostatistics and Geographical Information Systems (GIS) for the viperid snakes *Vipera latastei* and *V. monticola*. *Biol J Linn Soc.* **95**: 790-806.
- Brown JH, Lomolino MV (1998) *Biogeography*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Cesaroni D, Matarazzo P, Allegrucci G, Sbordoni V (1997) Comparing patterns of geographic variation in cave crickets by combining geostatistic methods and Mantel tests. *J Biogeogr* **24**: 419-431.
- Clark Labs (2003) Idrisi Kilimanjaro v.14.01. Clark Labs, Clark University, Worcester MA.
- Costa M, Morla C, Sainz H (1996). *Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica*. Editorial Planeta SA, Barcelona.
- Cundall D (1987) Functional morphology. In: Seigel RA, Collins JT, Novak SS (eds), *Snakes - Ecology and Evolutionary Biology*. Macmillan Publishing Co., New York, pp 106-140

- Darwin C (1859) On the Origin of Species. Literature.org, authors, Charles Darwin. <http://www.literature.org/authors/darwin-charles/the-origin-of-species/>
- Duguy R, Martínez-Rica JP, Saint-Girons H (1979) La répartition des vipères dans les Pyrénées et les régions voisines du nord de l'Espagne. Bull Soc Hist Nat Toulouse **115**: 359-377.
- ESRI (2006) ArcMap 9.2. Environmental Systems Research Institute, Inc, Redlands, CA.
- Fahy WE (1972) Influence of temperature change on number of vertebrae and caudal fin rays in *Fundulus Majalis* (Walbaum). Journal du Conseil **34**: 217-231.
- Fox W (1948) Effect of temperature on development of scutellation in the Garter snake, *Thamnophis elegans atratus*. Copeia **4**: 252-262.
- Garrigues T, Dauga C, Ferquel E, Choumet V, Failloux A-B (2005) Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. Mol Phyl Evol **35**: 35-47.
- Gifford ME (2008) Divergent character clines across a recent secondary contact zone in a Hispaniolan lizard. J Zool **274**: 292-300.
- Golay P, Monney J-C, Conelli A, Durand T, Thiery G, Zuffi MAL, Ursenbacher S (2008) Systematics of the Swiss asp vipers: some implications for the European *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) complex (Serpentes: Viperidae) – A tribute to Eugen Kramer. Amphibia-Reptilia **29**: 71-83.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Int J Climatol **25**: 1965-1978. <http://www.worldclim.org/>
- Johnston K, Ver Hoef JM, Krivoruchko K, Lucas N (2001) Using ArcGIS Geostatistical Analyst. Environmental Systems Research Institute, Inc., Redlands, CA.
- Kelley KC, Arnold SJ, Gladstone J (1997) The effects of substrate and vertebral number on locomotion of Garter snake *Thamnophis elegans*. Funct Ecol **11**: 189-198.
- Kidd DM, Ritchie MG (2000) Inferring the patterns and causes of geographic variation in *Ephippiger ephippiger* (Orthoptera, Tettigoniidae) using Geographical Information Systems (GIS). Biol J Linn Soc **71**: 269-295.
- King RB (1997) Variation in Brown Snake (*Storeria dekayi*) morphology and scalation: sex, family, and microgeographic differences. J Herpetol **31**: 335-346.
- Lenk P, Kalyabina S, Wink M, Joger U (2001) Evolutionary relationships among the True Vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol Phyl Evol **19**: 94-104.
- Lindell LE (1994) The evolution of vertebral number and body size in snakes. Funct Ecol **8**: 708-719.
- Lourdais O, Shine R, Bonnet X, Guillon M, Naulleau G (2004) Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. Oikos **104**: 551-560.
- Malhotra A, Thorpe RS (1997) Microgeographic variation in scalation of *Anolis oculatus* (Dominica, West Indies): a multivariate analysis. Herpetologica **53**: 49-62.
- Martínez-Freiría F, Brito JC, Lizana M (2006) Intermediate forms and syntopy among vipers (*V. aspis* and *V. latastei*) in Northern Iberian Peninsula. Herp Bull **97**: 14-18.

- Martínez-Freiría F, Sillero N, Lizana M, Brito JC (2008) GIS-based niche models identify environmental correlates sustaining a contact zone between European vipers. *Divers Distrib* **14**: 452-461.
- Moser A, Graber C, Freyvogel TA (1984) Observations sur l'éthologie et l'évolution d'une population de *Vipera aspis* (L.) au nord du Jura Suisse. *Amphibia-Reptilia* **5**: 373-393.
- Nikasnen M, Mappes J (2005) Significance of the dorsal zigzag pattern of *Vipera latastei gaditana* against avian predators. *J Anim Ecol* **74**: 1091-1101.
- Oliver MA (1990) Kriging: a method of interpolation for Geographical Information Systems. *Int J Geogr Inf Syst* **4**: 313-332.
- Peabody RB, Brodie ED (1975) Effect of temperature, salinity, and photoperiod on the number of trunk vertebrae in *Ambystoma maculatum*. *Copeia* **1975**: 741-746.
- Pinho C, Harris DJ, Ferrand N (2007) Comparing patterns of nuclear and mitochondrial divergence in a cryptic species complex: the case of Iberian and North African wall lizards (*Podarcis*, Lacertidae). *Biol J Linn Soc* **91**: 121-133.
- Pleguezuelos JM, 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.
- Pleguezuelos JM, Santos X, Brito JC, Parellada X, Llorente GA, Fahd S (2007) Reproductive ecology of *Vipera latastei*, in the Iberian Peninsula: Implications for the conservation of a Mediterranean viper. *Zool* **110**: 9-19.
- Pough FH (1980) The advantages of ectothermy for tetrapods. *Am Nat* **115**: 92-112.
- Pough FH, Janis CM, Heiser JB (2005) Vertebrate Life. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Saint-Girons H (1975) Coexistence de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un probleme de competition interspecific. *Terre et Vie* **29**: 590-613.
- Saint-Girons H (1978) Morphologie externe comparée et systématique des vipères d'Europe (Reptilia, Viperidae). *Rev suisse Zool* **85**: 565-595.
- Saint-Girons H (1980) Biogéographie et évolution des vipères européennes. *CR Soc Biogéogr* **496**: 146-172.
- Sanders KL, Malhotra A, Thorpe RS (2004) Ecological diversification in a group of Indomalayan pitvipers (*Trimeresurus*): convergence in taxonomically important traits has implication for species identification. *J Evol Biol* **17**: 721-731.
- Santos X, Brito JC, Sillero N, Pleguezuelos JM, Llorente GA, Fahd S, Parellada X (2006) Inferring habitat-suitability areas with ecological modelling techniques and GIS: a contribution to assess the conservation status of *Vipera latastei*. *Biol Conserv* **130**: 416-425.
- Santos X, Llorente GA, Pleguezuelos JM, Brito JC, Fahd S, Parellada X (2007) Variation in the diet of the Lataste's viper *Vipera latastei* in the Iberian Peninsula: seasonal, sexual and size-related effects. *Animal Biology* **57**: 49-61.

- Spear SF, Peterson CR, Matocq MD, Storfer A (2005) Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Mol Ecol* **14**: 2553-2564.
- Stearns SC, Hoekstra RF (2000) *Evolution. An introduction*. Oxford University Press, New York.
- Swenson NG (2006) GIS-based niche models reveal unifying climatic mechanisms that maintain the location of avian hybrid zones in a North American suture zone. *J Evol Biol* **19**: 717-725.
- Swenson NG (2008) The past and future influence of geographic information systems on hybrid zone, phylogeographic and speciation research. *J Evol Biol* **21**: 421-434.
- Szyndlar Z, Rage J-C (2002) Fossil record of the true vipers. In: Schuett GW, Höggren M, Douglas ME, Greene HW (eds), *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Utah, pp 419-444.
- Thorpe RS (1984) Geographic variation in the Western Grass Snake (*Natrix natrix helvetica*) in relation to hypothesized phylogeny and conventional subspecies. *J Zool* **203**: 345-355.
- Thorpe RS (1987) Geographic variation: a synthesis of cause, data, pattern and congruence in relation to subspecies, multivariate analysis and phylogenesis. *Boll Zool* **54**: 3-11.
- Thorpe RS, Báez M (1987) Geographic variation within an island: univariate and multivariate contouring of scalation, size and shape of the lizard, *Gallotia galloti*. *Evolution* **41**: 256-268.
- Tomović L (2006) Systematics of the Nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus, 1758). *Herp J* **16**: 191-201.
- Trutnau L, Böhme W, Joger U (2005) *Vipera (Vipera) aspis* (Linnaeus, 1758) – Aspisviper. In: Joger U, Stümpel N (eds), *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas: Schlangen (Serpentes) III*. Aula, Verlag, pp 151-185.
- West-Eberhard MJ (2003) Chapter 3. Plasticity. In: West-Eberhard MJ (ed), *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York, pp 34-55.
- Wüster W, Thorpe RS (1989) Population affinities of the asiatic cobra (*Naja naja*) species complex in south-east Asia: reliability and random resampling. *Biol J Linn Soc* **36**: 391-409.
- Zuffi MAL (2002) A critique of the systematic position of the asp viper subspecies *Vipera aspis aspis* (Linnaeus, 1758), *Vipera aspis atra* Meisner, 1820, *Vipera aspis francisciredi* Laurenti, 1768, *Vipera aspis hugyi* Schinz, 1833 and *Vipera aspis zinnikeri* Kramer, 1958. *Amphibia-Reptilia* **23**: 191-213.

Supplementary material

Vipera aspis COL-FMF: F (81) 4VA003, 4VA004, 4VA008, 4VA010, 4VA025, 4VA031, 4VA032, 4VA038, 4VA045, 4VA046, 4VA047, 4VA064, 4VA065, 4VA074, 4VA082, 4VA107, 4VA123, 4VA137, 4VA157, 5VA008, 5VA009, 5VA015, 5VA037, 5VA039, 5VA040, 5VA061, 5VA072, 5VA082, 5VA088, 5VA089, 5VA090, 5VA091, 5VA098, 5VA108, 5VA111, 5VA113, 5VA116, 5VA128, 5VA131, 5VA136, 5VA141, 5VA149, 5VA151, 5VA161, 5VA162, 5VA164, 5VA167, 5VA176, 5VA177, 5VA180, 5VA197, 5VA198, 5VA204, 5VA205, 5VA209, 5VA216, 5VA218, 5VA220, 5VA222, 5VA232, 6VA013, 6VA021, 6VA024, 6VA034, 6VA047, 6VA050, 6VA058, 6VA060, 6VA062, 6VA064, 6VA070, 6VA080, 6VA081, 6VA104, 6VA112, 6VA131, 7VA021, 7VA029, 7VA030, 7VA032, 7VA041; M (102) 4VA009, 4VA012, 4VA013, 4VA021, 4VA023, 4VA042, 4VA048, 4VA066, 4VA070, 4VA073, 4VA080, 4VA108, 4VA124, 4VA142, 4VA148, 4VA154, 4VA156, 5VA010, 5VA016, 5VA017, 5VA022, 5VA024, 5VA029, 5VA033, 5VA035, 5VA042, 5VA050, 5VA055, 5VA060, 5VA062, 5VA063, 5VA064, 5VA071, 5VA078, 5VA079, 5VA080, 5VA083, 5VA099, 5VA100, 5VA101, 5VA102, 5VA103, 5VA114, 5VA115, 5VA124, 5VA133, 5VA135, 5VA140, 5VA145, 5VA157, 5VA165, 5VA166, 5VA173, 5VA195, 5VA203, 5VA210, 5VA211, 5VA213, 5VA219, 5VA225, 5VA229, 5VA231, 5VA233, 6VA004, 6VA008, 6VA009, 6VA011, 6VA012, 6VA014, 6VA020, 6VA026, 6VA038, 6VA043, 6VA045, 6VA046, 6VA063, 6VA067, 6VA076, 6VA077, 6VA078, 6VA082, 6VA084, 6VA086, 6VA102, 6VA105, 6VA109, 6VA110, 6VA111, 6VA115, 6VA130, 6VA132, 7VA004, 7VA011, 7VA013, 7VA014, 7VA016, 7VA018, 7VA026, 7VA031, 7VA033, 7VA051, 7VA052. **IPE-JACA:** F (17) 45B, 48, 289, 318, 319, 432, 637, 1338, 1590, 1599, 1602, 1604, 1607, 1608, 1610, 1618, 2877; M (20) ?, 430, 716, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1600, 1601, 1603, 1605, 1609, 1622, 1623, 2876, 3452, 3940, 3941, 3945. **MCN-BAR:** F (14) 82-9190, 82-9191, 82-9198, 82-9200, 82-9204, 82-9208, 82-9210, 82-9213, 82-9214, 82-9215, 82-9217, 82-9220, 82-9221, 82-9241; M (17) 82-9189, 82-9193, 82-9203, 82-9209, 82-9212, 82-9221, 82-9243, 82-9244, 82-9245, 82-9246, 82-9250, 83-0469, 86-1742, 2001-0411, 2003-1442; Indet (2) 82-9233, 82-9235. **MNCN-MAD:** F (33) 8290, 8311, 9035, 9037, 9038, 15878, 38797, 38799, 38800, 38802, 38810, 38811, 38812, 38819, 38821, 38822, 38823, 38832, 38834, 38838, 38839, 38842, 38848, 38856, 38862, 38864, 38872, 38873, 38878, 38881, 39943, 39944, 39946; M (41) 9036, 8757, 9023, 9032, 9033, 9039, 9192, 10120, 12672, 12673, 15866, 15867, 38786, 38790, 38794, 38798, 38801, 38804, 38816, 38818, 38825, 38829, 38830, 38833, 38835, 38836, 38837, 38840, 38841, 38844, 38845, 38847, 38852, 38853, 38854, 38857, 38874, 38875, 38877, 38879, 38882. **SC-ARANZ:** F (17) AR-29, AR-144, AR-178, AR-186, AR-701, AR-702, AR-707, AR-725, AR-772, AR-773, AR-784, AR-823, AR-836, AR-989, AR-1808, AR-3575, AR-3583; M (10) AR(--), AR-143, AR-188, AR-348, AR-589, AR-706, AR-711, AR-718, AR-750, AR-765. **UNI-BAR:** F (3) 609, 5116, 5117; M (5) 1094, 5112, 5113, 5114, 5115. **UNI-SAL:** F (1) 3-1; M (6) A-A2, 2-1, 2-2, 5060483, 6060483, 1309483.

Vipera latastei COL-FMF: F (73) 4VL007, 4VL011, 4VL018, 4VL019, 4VL020, 4VL022, 4VL029, 4VL030, 4VL034, 4VL040, 4VL049, 4VL050, 4VL051, 4VL052, 4VL053, 4VL054, 4VL055, 4VL084, 4VL094, 4VL141, 4VL143, 4VL144, 4VL146, 4VL147, 4VL163, 5VL014, 5VL020, 5VL021, 5VL028, 5VL032, 5VL034, 5VL038, 5VL049, 5VL052, 5VL058, 5VL076, 5VL110, 5VL112, 5VL120, 5VL130, 5VL137, 5VL138, 5VL152, 5VL156, 5VL158, 5VL159, 5VL160, 5VL181, 5VL196, 5VL227, 6VL005, 6VL015, 6VL017, 6VL018, 6VL027, 6VL035, 6VL039, 6VL040, 6VL041, 6VL042, 6VL048, 6VL049, 6VL066, 6VL069, 6VL071, 6VL075, 6VL083, 6VL095, 6VL113, 6VL124, 6VL127, 7VL003, 7VL012, 7VL015, 7VL019, 7VL024; M (103) 4VL005, 4VL006, 4VL014, 4VL015, 4VL016, 4VL024, 4VL026, 4VL027, 4VL028, 4VL035, 4VL036, 4VL037, 4VL039, 4VL044, 4VL056, 4VL083, 4VL093, 4VL115, 4VL116, 4VL139, 4VL140, 4VL149, 4VL150, 4VL151, 4VL162, 4VL164, 5VL004, 5VL005, 5VL007, 5VL013, 5VL018, 5VL025, 5VL026, 5VL030, 5VL036, 5VL044, 5VL045, 5VL046, 5VL047, 5VL048, 5VL059, 5VL074, 5VL075, 5VL077, 5VL084, 5VL093, 5VL094, 5VL097, 5VL107, 5VL118, 5VL122, 5VL123, 5VL125, 5VL127, 5VL132, 5VL134, 5VL148, 5VL150, 5VL153, 5VL155, 5VL163, 5VL174, 5VL175, 5VL179, 5VL201, 5VL202, 5VL207, 5VL212, 5VL217, 5VL226, 5VL228, 6VL003, 6VL007, 6VL016, 6VL019, 6VL022, 6VL025, 6VL028, 6VL032, 6VL036, 6VL037, 6VL044, 6VL055, 6VL056, 6VL057, 6VL068, 6VL074, 6VL079, 6VL103, 6VL119, 6VL120, 6VL125, 6VL129, 7VL002, 7VL005, 7VL006, 7VL009, 7VL020, 7VL023, 7VL025, 7VL035, 7VL036, 7VL054. **EBD:** F (1) 29869; M (1) 69-08. **IPE-JACA:** F (2) 1188, 3944; M (6) 1209, 1613, 1614, 3927, 3947, 4024. **MMONTS:** F (1) 3; M (8) 1, 2, 4, 7, MM003-1, MM003-2, MM003-3, MM003-4; Indet (5) 5, 6, MM003-5, MM003-6, MM003-7. **MNCN-MAD:** F (16) 38885, 38956, 38959, 38960, 38961, 38963, 38964, 38982, 38986, 39022, 39023, 39030, 39949, 39956, 39959, 39961; M (15) 38922, 38957, 38969, 38972, 38973, 38990, 39024, 39025, 39026, 39027, 39028, 39951, 39962, 39963, 40192; Indet (10) 18724, 38962, 38965, 38966, 38971, 38979, 38981, 38987, 38988, 38989. **MONTP:** M (1) BEV663. **MCN-BAR:** F (2) 82-925-1, 82-925-2; M (2) 83-043, 2000-0. **UNI-BAR:** F (2) 9004, 9015; M (10) 338, 9001, 9002, 9005, 9006, 9007, 9008, 9009, 9010, 9013.

Intermediate vipers COL-FMF: F (41) V_001, 4V_033, 4V_041, 4V_043, 4V_069, 4V_075, 4V_081, 4V_145, 4V_161, 5V_019, 5V_023, 5V_027, 5V_041, 5V_043, 5V_053, 5V_054, 5V_081, 5V_085, 5V_086, 5V_105, 5V_109, 5V_121, 5V_144, 5V_147, 5V_221, 5V_234, 6V_006, 6V_023, 6V_033, 6V_051, 6V_059, 6V_085, 6V_094, 6V_096, 6V_097, 6V_114, 6V_118, 6V_122, 6V_123, 6V_126, 7V_034; M (52) 4V_002, 4V_092, 4V_125, 4V_138, 4V_152, 4V_153, 4V_155, 5V_001, 5V_002, 5V_003, 5V_006, 5V_011, 5V_012, 5V_031, 5V_051, 5V_073, 5V_087, 5V_092, 5V_095, 5V_096, 5V_119, 5V_129, 5V_178, 5V_182, 5V_199, 5V_206, 5V_208, 5V_214, 5V_222, 5V_223, 5V_230, 6V_001, 6V_002, 6V_010, 6V_031, 6V_052, 6V_061, 6V_072, 6V_073, 6V_101, 6V_117, 6V_128, 7V_001, 7V_007, 7V_008, 7V_010, 7V_017, 7V_022, 7V_027, 7V_028, 7V_040, 7V_053. **IPE-JACA:** M (5) 1616, 1617, 1619, 1621, 1624.

List S1 Catalogue number of examined specimens during the field work in High Ebro and in herpetological collections, divided by species, source (bold) and sex.

Legend for source: COL-FMF High Ebro, EBD Estación Biológica de Doñana, CSIC (Seville), IPE-JACA Instituto Pirenaico de Ecología, CSIC (Jaca), MCN-BAR Museu de Ciències Naturals of Barcelona (Barcelona), MMONTS Monestir de Montserrat (Barcelona), MNCN-MAD Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC (Madrid), MONTP Laboratoire de Biogéographie et Écologie des Vertébrés (Montpellier), SC-ARANZ Sociedad de Ciencias Aranzadi (Donostia), UNI-BAR Departament de Biologia Animal, Barcelona University (Barcelona), UNI-SAL Departamento de Biología Animal, Salamanca University (Salamanca).

Table S2 Statistical measures to assess the performance of the Kriging interpolation of morphological traits from specimens of *Vipera aspis* and *V. latastei* in NE Iberia. N UTM cells refer to the number of 10x10 km UTM cells for which data was available for a given trait.

Trait	Mean error	Root mean square error	Average S.E.	Mean Standardised	Root-mean-square S.E.	N UTM cells
APICA	-0.001	0.879	1.021	0.000	0.861	138
DMARK	0.025	6.621	7.197	0.002	0.920	127
INFRR	-0.011	0.916	0.921	-0.011	0.997	133
INTER	-0.008	6.102	6.166	-0.001	0.989	132
LORR	0.004	1.085	1.101	0.003	0.985	133
PERIR	0.009	0.768	0.756	0.011	1.016	134
SUBCAF	0.022	2.486	2.477	0.010	1.001	79
SUBCAM	0.010	2.862	2.814	0.006	1.012	94
SUPRR	-0.006	0.600	0.579	-0.011	1.035	134
VENTF	0.017	5.311	5.166	0.001	1.026	78
VENTM	0.048	4.515	5.021	0.006	0.904	99

Table S3 Statistical measures to assess the performance of the Kriging interpolation of morphological traits from specimens of *Vipera aspis* and *V. latastei* in High Ebro. N GPS locals refer to the number GPS localities for which data was available for a given trait.

Trait	Mean error	Root mean square error	Average S.E.	Mean Standardised	Root-mean-square S.E.	N GPS locals
APICA	-0.005	0.970	1.119	-0.004	0.875	333
DMARK	-0.016	6.623	7.120	-0.002	0.934	322
INFRR	-0.005	0.974	0.958	-0.005	1.015	306
INTER	0.001	6.004	5.804	0.001	1.035	302
LORR	0.006	1.436	1.443	0.004	0.995	292
PERIR	0.047	0.962	0.980	0.048	0.982	298
SUBCAF	0.020	2.378	2.337	0.005	1.023	134
SUBCAM	0.029	2.750	2.749	0.011	1.007	176
SUPRR	-0.005	0.701	0.675	-0.008	1.042	311
VENTF	0.030	5.036	5.121	0.004	0.982	126
VENTM	0.014	4.627	4.491	0.000	1.027	174

Figure S4 Average annual precipitation (PREC) and temperature seasonality (TEMPS) of the study areas. These environmental variables were mostly correlated with geographic variation in morphological traits of *Vipera aspis* and *V. latastei* in NE Iberia and High Ebro. Each symbol in the map represents a 10x10km UTM cell (NE Iberia) or a GPS location (High Ebro) for which specimens with morphological data were available.

Rasgos ecológicos

Ecological traits

Ofidiofagia y canibalismo en *Vipera latastei*

Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae)

Ophiophagy and cannibalism in *Vipera latastei*

Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae)

Fernando Martínez-Freiría, José C. Brito, Miguel Lizana Avia

The Herpetological Bulletin 96: 26-28. 2006

Ofidiofagia y canibalismo en *Vipera latastei* Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae)

Resumen en castellano de

Martínez-Freiría et al. (2006). *The Herpetological Bulletin* **96**: 26-28.

La dieta normal de muchas serpientes la constituye otras serpientes (ej. *Ophiophagus hannah*, *Clelia clelia*). En Europa, no existen serpientes verdaderamente ofidiófagas, no obstante, algunas especies pueden atacar y depredar sobre otras serpientes (ej. *Malpolon monspessulanus*).

A excepción de casos como estos, la ofidiofagia se considera como un comportamiento aberrante debido a un estímulo inapropiado y que usualmente ocurre en condiciones de cautividad tras largos períodos de ayuno.

En esta nota, se informa de ofidiofagia y canibalismo en condiciones naturales y de cautividad para la víbora hocicuda (*Vipera latastei* Boscá, 1878). *V. latastei* es una serpiente mediterránea de pequeña talla distribuida por la Península Ibérica y norte de África. Su dieta al igual que el resto de las víboras europeas consiste, después de la maduración sexual, en pequeños mamíferos (Soricidae y Rodentia). Nunca se ha informado de la inclusión en su dieta de serpientes.

Se detallan dos observaciones de ofidiofagia en *V. latastei* del valle de Sedano. La primera ocurrió en septiembre de 2004 durante la realización de un experimento en cautividad en el que se recibieron varias hembras preñadas durante los últimos días de su gestación. Un macho fue introducido con una hembra preñada y tras cinco días sin observarse interacciones, la hembra parió cinco neonatos y el macho desapareció. Mediante palpación y pesado, se comprobó que había sido comido por la hembra. Después la hembra parió dos neonatos más. La segunda observación se realizó el 27 de abril de 2005 durante un muestreo de campo. Se capturó un juvenil que pocos minutos después regurgitó otro juvenil de *Coronella austriaca*.

La naturaleza de ambas observaciones es radicalmente distinta. La primera fue realizada en condiciones de cautividad y pudo deberse a un comportamiento aberrante. Sólo se conocen comportamientos caníbales en la naturaleza para *V. ammodytes*. Los estudios en semi-cautividad confirman la falta de intolerancia intraespecífica, sin embargo, en cautividad los cuidadores de serpientes tienen que ser cuidadosos a la hora de eliminar cualquier olor cuando ponen dos serpientes juntas. Nada se conoce sobre marcaje de territorio y reconocimiento en serpientes en condiciones

de cautividad. En estado salvaje, machos y hembras sólo se pueden encontrar juntos durante la hibernación y las épocas de reproducción. El resto del ciclo anual se comportan como animales solitarios y seleccionan hábitats diferentes, lo que puede evitar la ocurrencia de comportamientos caníbales. Debido a la falta de alimentación de las hembras reproductoras durante la gestación, las hembras post-parto están muy demacradas y encontrar comida es algo crucial para su supervivencia. La presencia de un macho más pequeño en un terrario pequeño tras el parto debió provocar un estímulo inapropiado en la hembra, llevándola a que depredara sobre éste.

La segunda observación fue realizada en condiciones naturales y puede deberse a variaciones locales en la dieta de *V. latastei*, de acuerdo con la alta abundancia de *C. austriaca* y el hecho de compartir hábitats similares en el valle de Sedano.

Ophiophagy and cannibalism in *Vipera latastei* Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae)

Fernando Martínez-Freiría¹, José C. Brito^{2,3} and Miguel Lizana Avia¹

1* Dpto. Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

2 CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Instituto de Ciências Agrárias de Vairão, R. Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal

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

*Address for correspondence: Pazos de Reis, Circos 26. 36715 Tui, Pontevedra, Spain E-mail: flyssi@lycos.es

The normal or occasional diet of many snake species includes other snakes. Species such as the King Cobra (*Ophiophagus hannah*) from southeastern Asia or the Mussurana (*Clelia clelia*) from the Amazon rainforest are reported to be largely ophiophagic (Gasc, 1994). Some North American crotalids, members of the genera *Crotalus* and *Sistrurus*, primarily prey on endotherms; however newborns of both genera may prey on other snakes (Mushinsky, 1987). In Europe, there are no truly ophiophagic snakes, but some species such as the Montpellier snake (*Malpolon monspessulanus*), the Western whip snake (*Coluber viridiflavus*) or the European smooth snake (*Coronella austriaca*) also attack and prey on other snakes, including vipers (Bellairs, 1975; Gasc, 1994). About 20 species of snakes are reported to be cannibalistic (Polis & Myers, 1985).

With the exception of species adapted to eat other snakes, ophiophagy is considered an aberrant behaviour released by an inappropriate stimulus (Fox, 1975). Although this phenomenon has been observed in the wild, it typically occurs under captive conditions. For instance, it occurs in boids, when two specimens share a terrarium and select the same prey. One of them, usually the smaller, can be swallowed after the prey by the larger snake (Gasc, 1994). It also occurs after long periods of fasting, when a snake is stimulated by a prey situated within its striking range, regardless of whether or not the prey is another snake or a conspecific (Bruno & Maugeri, 1990).

In this note, ophiophagy and cannibalism is reported in wild and in captive conditions for Lataste's Viper (*Vipera latastei* Boscá, 1878). *Vipera latastei* is a small viviparous Mediterranean snake, distributed throughout most of the Iberian Peninsula, except for a narrow strip in the north, and in North Africa from Morocco to Tunisia (Pleguezuelos & Santos, 2002). It is an ambush predator with a similar diet pattern to the rest of European vipers, with the exception of *V. ursinii* (Bea & Braña, 1988; Bea *et al.*, 1992; Brito, 2004). Its diet before sexual maturation consists mostly of

ectothermic prey such as reptiles of the family Lacertidae, and endothermic prey such as small mammals of the Soricidae and Rodentia groups after sexual maturation (Saint-Girons, 1980; Bea *et al.*, 1992; Brito, 2004). Less frequently, it also feeds on invertebrates of the Mollusca, Myriapoda and Coleoptera groups (Bea & Braña, 1988; Brito, 2004), and other vertebrates such as amphibians, birds and mustelid mammals (López Jurado & Caballero, 1981; Bea & Braña, 1988; Brito, 2004). To our knowledge (Valverde, 1967; López Jurado & Caballero, 1981; Bea & Braña, 1988; Bea *et al.*, 1992; Brito, 2004), snakes have never been reported in the diet of *V. latastei*.

Two observations of ophiophagy in *Vipera latastei* from Sedano valley (latitude 42°43'13''N and longitude 3°45'03''W), north-western Burgos, north of Spain, are detailed. The first observation occurred in September 2004 when several pregnant females were kept in glass terrariums (54 x 30 x 30 cm) during the last 20 days of gestation for reproductive experiments. On 1st September an adult male of 400 mm snout-vent length (SVL) was introduced in a terrarium with a pregnant 525 mm SVL female. After a 5-day period without observing interactions between the two specimens, the male disappeared and five newborns were found in the terrarium. The palpation of the female allowed the clear identification of the male inside the stomach of the female. After the male was eaten, the female gave birth to two newborns more. The pregnant female weighted 180 g, the total weight of the offspring (including embryonic tissues) was 74 g, the male weighted 66 g and the post-partum female with the male in the stomach weighted 171 g. The second observation was made on 27th April 2005 during a field survey. A juvenile of *V. latastei* with an SVL of 167 mm was captured and a few minutes latter disgorged a juvenile 168 mm SVL *Coronella austriaca*.

Although both observations increase the current knowledge about the foraging ecology of *V. latastei*, the nature of such observations is radically different. The first observation was made under captive conditions and could be the result of an aberrant behaviour due to the conditions of captivity. Only *V. ammodytes* is reported to be cannibalistic in the field (Beskov & Dushkov, 1981; Mario Schweiger, pers. comm.). Whereas studies in semi-wild conditions (large open terrariums) confirm the lack of intraspecific intolerance when two specimens are placed in contact (Bellairs, 1975), in captive conditions (small closed terrariums) snake keepers have to be careful when placing vipers together as they should eliminate smells by washing the terrariums (Mario Schweiger, pers. comm.). Although social behaviour and intraspecific chemical recognition were studied in many snake species (Ford & Burghardt, 1993), including European vipers (Andrén, 1976, 1982), nothing is known about territory marking by smell and interspecific recognition by smell under captive conditions. In the field, both sexes of *V. latastei* can only be found together during the hibernation and mating seasons. During the rest of the annual cycle, vipers are solitary animals, with pregnant females and males selecting different habitat types during the gestation

period (authors, pers. obs.). This habitat segregation could avoid the occurrence of cannibalistic behaviours. Pregnant females of *V. latastei* usually do not feed during the final stages of gestation due to physical constraints in the abdominal cavity caused by the developing offspring (Bea *et al.*, 1992). Thus, post-partum females are largely emaciated and finding food is a crucial step for survival (Madsen & Shine, 1992). The presence of the smaller male in a small terrarium at the moment after parturition might have released an inappropriate stimulus, leading to predation by the female.

The second observation was made under natural conditions and should reflect local variation in the diet composition of this viper. In the Sedano valley, *C. austriaca* is very abundant and it shares similar habitats to *V. latastei*, and thus could be a potential prey species for this viper. *Vipera latastei* occurs in a wide range of environments, from sea level to mountain areas, in sub-humid, humid and semi-arid Mediterranean climates (Pleguezuelos & Santos, 2002) and should exhibit local variation in diet composition according to prey availability.

Acknowledgements

This study was partially supported by the project POCTI/BIA-BDE/55596/2004 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal). F. Martínez-Freiría was supported by PhD grant (AP2003-2633) from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain) and J.C. Brito was supported by a Post-doctoral grant (SFRH/BPD/11542/2002) from FCT. Authors acknowledge “Asociación Sociocultural Hoces del Alto Ebro y Rudrón”.

References

- Andrén, C. (1976). Social behaviour during the reproductive period in *Vipera b. berus* (L.). *Norw. J. Zool.* **24**, 234–235.
- Andrén, C. (1982). The role of the vomeronasal organs in the reproductive behavior of the adder *Vipera berus*. *Copeia* **1982**, 148–157.
- Bea, A. & Braña, F. (1988). Nota sobre la alimentación de *Vipera latastei*, Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae). *Munibe* **40**, 121–124.
- Bea, A. & Braña, F. (1998). *Vipera latasti*. In *Fauna Ibérica. Volumen 10. Reptiles*, pp. 480-488. Salvador, A. (Coordinator). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Bea, A.; Braña, F.; Baron, J.P. & Saint-Girons, H. (1992). Régimes et cycles alimentaires des vipères européennes (Reptilia, Viperidae). *Année Biologique* **31**, 25–44.
- Bellairs, A. (1975). *Los Reptiles*. Historia Natural Destino. Tomo 11.
- Beskov, V. & D. Dushkov (1981). Materials on the Batrachophagy and Herpetophagy of Snakes in Bulgaria (in Bulgarian with short English summary). *Ekology* **9**, 43–50.
- Brito, J. C. (2004). Feeding ecology of *Vipera latastei* in Northern Portugal: ontogenetic shifts, prey size and seasonal variations. *Herpetol. J.* **14**, 13–19.
- Bruno, S. & Maugeri, S. (1990). *Guía de las Serpientes de Europa*. Editoriale Giogio Mondadori.

- Ford, N. B. & Burghardt, G. M. (1993). Perceptual mechanisms and the behavioral ecology of snakes. In *Snakes - Ecology & Behavior*, pp. 117–164. Seigel, R.A. & Collins, J.T. (Eds.). New York: McGraw-Hill Inc.
- Fox, L. R. (1975). Cannibalism in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 6: 87-106.
- Gasc, J.P. (1994). Prédation et nutrition. In *Les Serpents*, 108–121. Bauchot, R. (Ed.). Paris: Bordas.
- López Jurado, L. F. & Caballero, M. R. (1981). Predación de *Vipera latastei* sobre *Mustela nivalis*. *Doñana Acta Vertebrata* 8, 298–299.
- Madsen, T. & Shine, R. (1992). Determinants of reproductive success in female adders, *Vipera berus*. *Oecologia* 92, 40–47.
- Mushinsky, H. R. (1987). Foraging Ecology. In *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, pp. 302–334. Seigel, R. A. Collins, J. T. & Novak, S. S. (Eds.). New York: Macmillan Publishing Co.
- Pleguezuelos, J. M. & Santos, X. (2002). *Vipera latastei* In *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*, pp. 298–300. Pleguezuelos, J. M. Márquez, R. & Lizana, M. (Eds.). Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza – Asociación Herpetológica Española.
- Polis, G. A. & Myers, C. A. (1985). A survey of intraspecific predation among reptiles and amphibians, *J. Herpetol.* 19, 99–107.
- Saint-Girons, H. (1980). Modifications sélectives du régime des vipères (Reptilia, Viperidae) lors de la croissance. *Amphibia-Reptilia* 1, 127-136.
- Valverde, J. A. (1967). *Estructura de una Comunidad Mediterránea de Vertebrados Terrestres*. Monografías de Ciencia Moderna, 1. CSIC.

**Comparación de los rasgos ecológicos de dos víboras
mediterráneas en una zona híbrida: competencia
interespecífica, segregación de nicho
y ventajas competitivas**

**Comparative ecological traits of two Mediterranean vipers
in a hybrid zone: interspecific competition, niche
segregation, and competitive advantages**

Fernando Martínez-Freiría, Miguel Lizana, José Pedro do Amaral, José C. Brito

Submitted to *Amphibia-Reptilia* 2009

Comparación de los rasgos ecológicos de dos víboras mediterráneas en una zona híbrida: competencia interespecífica, segregación de nicho y ventajas competitivas.

Resumen en castellano de

Martínez-Freiría et al. submitted to *Amphibia-Reptilia* 2009

Introducción

La competencia interespecífica puede ocurrir cuando dos o más especies con similares requerimientos ecológicos comparten el mismo área; si los recursos son limitados, una especie puede tener baja fecundidad, supervivencia o crecimiento como resultado de la interacción con la otra u otras especies, llegando incluso a ser excluida competitivamente. Sin embargo, la selección natural puede llevar a la segregación ecológica de nicho y así reducir las interacciones competitivas; esto puede tener repercusiones en los rasgos reproductivos y/o demográficos de las especies en competencia y conferir ventajas competitivas a una de las especies en detrimento de las otras, puesto que afectan a las dinámicas poblacionales.

Existen unos pocos estudios sobre los efectos de la competencia interespecífica en los rasgos reproductivos y demográficos. Sin embargo, existe una gran cantidad sobre requerimientos de nicho de especies en competencia y que han señalado diferencias en los tres ejes básicos del nicho de una especie, el trófico, el espacial y el temporal, o una combinación de diferencias en varios ejes.

Las especies cercanas filogenéticamente, como las especies alopátricas, suelen competir por los recursos cuando sus distribuciones se superponen. Además, en las zonas de contacto estas especies cercanas usualmente experimentan procesos de intercambio genético. Tradicionalmente, la hibridación natural se ha visto como un mecanismo para completar la especiación, postulándose la hipótesis de refuerzo como medio para evitar híbridos con menor eficacia biológica. Sin embargo, la hibridación natural también se interpreta como un proceso generador de nuevos genotipos o como un mecanismo que puede permitir la expansión en hábitats no favorables. Por lo tanto, en las zonas híbridas la competencia entre las diferentes formas ha de ser muy fuerte y la segregación de nicho no sólo puede permitir la coexistencia sino que también el aislamiento de los híbridos de las formas parentales.

Las víboras europeas son un buen modelo para estudiar interacciones competitivas y mecanismos de segregación de nicho en las zonas de contacto. Se trata de un grupo monofilético, que evolucionó bajo procesos de especiación alopátrica y que presentan similares requerimientos ecológicos. Sus rangos de distribución son alopátricos pero se solapan en zonas de contacto donde la competencia interespecífica desempeña un importante papel y la segregación espacial permite la coexistencia. Sin embargo, todavía no se conoce el papel de la competencia interespecífica y los mecanismos de segregación de nicho en las zonas de contacto entre especies cercanas filogenéticamente.

En la Península Ibérica existen tres especies de víboras con distribución parapátrica, dos cercanas filogenéticamente de origen mediterráneo, *V. aspis* y *V. latastei*, y otra más distante de origen euro-siberiano, *V. seoanei*. Tienen varias zonas de contacto pero la existencia de simpatría sólo se ha sugerido para el par hermano *aspis-latastei* en seis áreas de la península. En una de ellas, el Alto Ebro, se ha observado la existencia de simpatría en un área de 8 km² y mediante técnicas de modelación de nicho se ha identificado una zona de 76 km² de transición ambiental donde la simpatría podría ocurrir potencialmente. En esta zona ambas especies convergen morfológicamente y análisis genéticos han descubierto que muchos individuos con características intermedias son híbridos entre ambas especies. Además, se ha observado la existencia de canibalismo lo que hace suponer la existencia de fuertes interacciones competitivas.

En este estudio, se compararán, bajo los escenarios de competencia interespecífica y segregación de nicho, los siguientes rasgos ecológicos de *V. aspis*, *V. latastei* y los híbridos de la zona de contacto del Alto Ebro: preferencias de dieta, uso del micro-hábitat, patrones de actividad, rasgos reproductivos y demográficos. Los tres primeros nos permitirán determinar las preferencias de nicho, mientras que, los dos últimos, nos suministrarán información sobre las dinámicas poblacionales y las ventajas competitivas de las tres formas. Además, estos últimos rasgos nos permitirán inferir la eficacia biológica de los híbridos en la zona híbrida.

Material y métodos

Área de estudio

El área de estudio comprende la zona híbrida entre *V. aspis* y *V. latastei* del Alto Ebro en el Norte de España. Consiste en un área de transición entre las regiones bioclimáticas euro-siberiana y mediterránea, lo que se traduce en una variación gradual de factores climáticos como la precipitación y temperatura.

Datos de campo

Se han utilizado seis metodologías diferentes, durante marzo de 2004 y octubre de 2007: 1) transectos al azar por el área de estudio, en los que se han capturado víboras para su medición, sexado y recogimiento de heces; 2) transectos en coche por el área de estudio, en los que se han recogido especímenes atropellados para su posterior medición y disección; 3) mantenimiento en cautividad de hembras preñadas durante los últimos días de gestación, en los que se han tomado diferentes medidas reproductoras de las hembras y de los neonatos; 4) transectos estandarizados en cinco zonas del área central de simpatria, con los que se ha determinado la abundancia relativa de las diferentes formas; 5) monitorización mediante técnicas de telemetría de machos adultos, con la que se ha recogido información sobre selección de hábitat y patrones de actividad; 6) observaciones de campo, en las que se ha obtenido información sobre reproducción, uso de micro-hábitat y actividad, utilizada para completar la información obtenida con las otras metodologías.

Los especímenes han sido clasificados de acuerdo con un criterio morfológico (ver capítulo 2) y análisis genéticos, conformando un total de 188 *V. aspis* (83 hembras y 105 machos), 180 *V. latastei* (75 hembras y 105 machos) y 93 híbridos (40 hembras y 53 machos) (Table 1).

Implantación de los radio-transmisores

Se han utilizado dos tipos de radio-transmisores, pesando cada tipo 4 y 3 g y representando de media el 3.99% del peso de las víboras. La implantación subcutánea ha seguido la metodología descrita por Weatherhead y Anderka (1984).

Los machos fueron monitorizados entre febrero de 2006 y junio de 2007, dando lugar a 1669 observaciones (629 para cuatro machos de *V. aspis*, 488 para tres machos de *V. latastei* y 552 para tres machos híbridos). Los machos se localizaron una media de 10.8 días por mes, tres veces al día, entre las 0600 y las 2100 horas.

Análisis de las preferencias de dieta

Los contenidos estomacales e intestinales se clasificaron hasta nivel de género usando claves de identificación. Las presas se agruparon en cuatro categorías: invertebrados, reptiles, mamíferos-Soricomorpha y mamíferos-Rodentia.

Se testaron diferencias ontogénicas y sexuales en la composición de la dieta. Los análisis entre formas se llevaron a cabo usando test de χ^2 para comparar la composición de la dieta, la variación anual y la frecuencia de consumo. Se usaron los índices de Levin y Pianka para medir la amplitud y el solapamiento de nicho, respectivamente.

Análisis de la selección de micro-hábitat

Se usaron un total de 297 localizaciones de presencia independientes (109 para los machos de *V. aspis*, 90 para los machos de *V. latastei* y 98 para los machos híbridos) registradas a lo largo del ciclo anual de actividad (se excluyó el invierno). También se registraron el mismo número de localizaciones de ausencia en lugares donde nunca se hallaron víboras. En cada localización se midieron las siguientes variables (no correlacionadas) en un área de 9m²: pendiente, % de suelo desnudo, % de rocas, % de musgo o sustrato cobertor, % arbustos y % de árboles. Los datos se utilizaron agrupados por forma y estación mediante regresión logística.

Análisis de los patrones de actividad

Se usaron tres indicadores de actividad: 1) % de machos activos; 2) ratio distancia recorrida/días con movimiento (AMR); 3) tamaño del área vital, usando el estimador KERNEL. Los dos últimos estimadores de actividad fueron obtenidos con ayuda del software ArcGis 9.2 y las comparaciones entre formas fueron hechas por medio de test de χ^2 .

Análisis de los rasgos reproductivos

Debido al bajo tamaño de muestra los siguientes parámetros no se analizaron estadísticamente: fecundidad potencial (número y media de folículos > 10 mm de diámetro), fecundidad efectiva (media de neonatos por camada) y esfuerzo reproductor (peso camada/peso de la hembra después del parto).

La biometría, mortalidad y rasgos de muda de los neonatos fueron determinados usando los nacimientos en cautividad. Se compararon, usando test ANOVA de una vía y agrupando los neonatos por camada y forma, los siguientes parámetros: longitud hocico-cloaca (SVL), peso, número de neonatos no natos (NSB), número de neonatos que mudaron tras el parto (NMAP) y número de neonatos que retuvieron fragmentos de la muda (NWFS).

La frecuencia reproductora se calculó como la proporción de hembras reproductora respecto al total de hembras adultas por año. Se desarrollaron test de χ^2 entre las formas por año y juntando los datos para tres años. Además, se analizó la relación entre variación climática y la proporción de hembras reproductoras por año.

Análisis de los rasgos demográficos

Se usaron test de χ^2 para comparar la abundancia relativa de cada forma por sexo y edad. Se calculó la mortalidad para un tramo de carretera de 3.62 km en los alrededores de los transectos estandarizados, comparando entre formas, por sexo y edad, mediante test de χ^2 .

Resultados

Preferencias de dieta

No hubo diferencias significativas en la composición de la dieta entre sexos y formas. Para las tres formas el índice de Levin fue relativamente bajo y el de Pianka alto (Table 1).

La frecuencia de consumo sólo fue significativamente diferente entre *V. aspis* y los híbridos, siendo mayor para los últimos. Hay una tendencia para diferencias entre las formas en la consumición de presas por estaciones (Table 1). El período de consumo de presas fue más largo en *V. aspis* que en *V. latastei* y los híbridos, respectivamente (Table 1).

Selección de micro-hábitat

Los modelos desarrollados para cada forma por estación han resultado relativamente buenos (Table 1).

Los modelos identificaron varias variables significativamente relacionadas a los micro-hábitats seleccionados por los machos (Table 1). El % de arbustos y el % de rocas influyen en la selección de hábitats de las tres formas: los machos compiten por áreas con gran cantidad de estos elementos según las estaciones (Table 1). Además, varias variables están relacionadas con los hábitats seleccionados por los pares de formas por estación (Table 1). Sin embargo, hubo diferencias específicas en la selección de microhábitats por parte de los machos en cada estación.

Además, las observaciones de campo sugieren el uso de distintos lugares para hibernar, aunque se ha encontrado un lugar de hibernación con especímenes de las tres formas, y para la gestación de las hembras.

Patrones de actividad

No hubo diferencias significativas en el % de machos activos para las tres formas. Sin embargo, los machos de *V. aspis* parecen tener un período de actividad más corto. Además, los machos de *V. latastei* parecen estar inactivos durante el verano (Table 1).

Hubo diferencias significativas en el AMR entre los machos de las tres formas, con picos de diferente intensidad en primavera y otoño (Fig. 1).

Hubo diferencias significativas en las áreas vitales de las tres formas a lo largo del año, con picos de diferente intensidad en primavera y otoño (Fig. 2).

Los períodos de muda observados son similares entre los machos y las hembras de las tres formas, respectivamente (Table 1).

Rasgos reproductivos

Cópulas y comportamientos reproductores sólo han sido detectados durante la primavera para las tres formas (Table 1). Sin embargo, parejas de machos y hembras híbridas, interespecíficas e híbridas con las formas parentales han sido detectadas también durante septiembre y octubre, lo que sugiere la ocurrencia de otro período de cópula durante otoño para las tres formas. Se estimó una talla mínima de maduración sexual similar para machos y hembras de *V. aspis* y *V. latastei*, pero mayor para los híbridos (Table 1). La época de parto fue similar entre las hembras de las tres formas (Table 1).

La fecundidad potencial y efectiva fue mayor para *V. latastei*, mientras que los híbridos mostraron un valor intermedio de folículos y embriones (Table 1). El esfuerzo reproductor para los híbridos y *V. latastei* fue similar y superior a *V. aspis*.

Hubo diferencias significativas entre los neonatos pero sólo cuando estos fueron agrupados por formas. Los neonatos de *V. aspis* fueron más largos y pesados que los de *V. latastei*, mientras que los híbridos tuvieron características intermedias. Los neonatos de *V. aspis* tuvieron el valor más bajo para NSB y más alto para NWFS, los de *V. latastei* el más alto para NSB y NMAP y los híbridos el valor más bajo para NMAP (Table 1).

Los ciclos reproductores fueron similares entre las formas para cada año pero variaron entre los años. La media de la proporción de hembras reproductoras indica un ciclo de reproducción de tipo trianual para las tres formas.

Rasgos demográficos

Hubo diferencias significativas en la abundancia relativa de las tres formas: los híbridos fueron más abundantes que las formas parentales (Fig. 3). Hubo una tendencia para una diferente mortalidad en carretera entre las tres formas: las hembras y juveniles de *V. latastei* y los juveniles híbridos tuvieron la mayor mortalidad (Fig. 3).

Discusión

Similitudes en la dieta y las preferencias de micro-hábitat de las tres formas muestran que la competencia interespecífica juega un papel fundamental en la dinámica de esta zona híbrida. Diferencias en el uso del micro-hábitat y los patrones de actividad sugieren la ocurrencia de segregación de los nichos espacial y temporal, lo que debe estar relajando las interacciones competitivas entre las tres formas. Sin embargo, estas diferencias están aparentemente afectando la fecundidad, abundancia y mortalidad, y confiriendo ventajas competitivas a las diferentes formas. Además, la población híbrida debe estar bien establecida según muestra su *fitness* reproductora.

Competencia interespecífica y partición del nicho

La víboras europeas no suelen segregar la dieta cuando coexisten, ya que básicamente depredan sobre la presa más abundante. Las víboras del Alto Ebro replican este patrón, con lo que han de estar compitiendo intensamente por este recurso. No obstante, tres factores podrían estar minimizando esta competencia: 1) la gran densidad de micromamíferos del área de simpatria; 2) diferencias en las épocas de consumo de presas (diferencias en el período y frecuencia de consumo); 3) una dieta de *V. aspis* más especializada en roedores. Por lo tanto, aunque la competencia en el eje trófico debe ser muy alta entre las víboras del Alto Ebro, estos tres factores podrían estar reduciendo la intensidad de las interacciones competitivas.

La selección de micro-hábitats diferentes, debido a diferentes necesidades y habilidades térmicas de las especies pero también mediado por la competencia interespecífica, ha sido confirmado como el principal mecanismo de coexistencia entre las víboras europeas en las zonas de contacto. En el Alto Ebro, las tres formas seleccionan micro-hábitats similares, con lo que debería existir una fuerte competencia interespecífica por el espacio. Además, la observación y detección de comportamientos caníbales sugieren la ocurrencia de exclusión competitiva, que llevaría a algunas formas a usar otros microhábitats. Esto parece que es lo que ocurre durante el verano para los machos y hembras reproductoras de *V. aspis* que aparentemente son excluidos a micro-hábitats subóptimos. Sin embargo, son necesarios estudios sobre termorregulación y características térmicas de los lugares seleccionados por las diferentes formas para corroborar esta hipótesis.

La actividad es el tercer eje en el que especies similares en contacto pueden diferir para evitar competir e, incluso, hibridarse. Esto también ha sido comprobado en víboras europeas en las zonas de contacto pero estas diferencias han sido achacadas a diferentes necesidades y habilidades térmicas de las especies, más que a la competencia interespecífica. En el Alto Ebro existen diferencias significativas en la actividad de las tres formas y, aunque los períodos de cópula son similares entre las tres formas su intensidad parece verse afectada por la competencia interespecífica. Sin embargo, el efecto de la competencia interespecífica en la segregación temporal se mantiene desconocida al no existir estudios sobre termorregulación.

Ventajas competitivas

Las diferencias en la dieta, micro-hábitat y actividad de las tres formas parecen influenciar los rasgos reproductivos y demográficos de las tres formas en el Alto Ebro.

En el Alto Ebro, existen diferencias marcadas en los rasgos reproductivos de *V. aspis* y *V. latastei*. Estas diferencias no existen, o presentan distintos patrones, en poblaciones alopátricas de ambas especies, por lo que pueden ser debidas un uso diferencial de los recursos en el Alto Ebro.

Por ejemplo, esto parece ocurrir durante la gestación de las hembras y la selección de microhábitats, donde sub-óptimas necesidades térmicas parecen provocar mayor mortalidad y deficiencias en la muda de los neonatos de *V. aspis*. Por lo tanto, atendiendo a los rasgos reproductivos, *V. aspis* es aparentemente menos competitiva que *V. latastei* en el Alto Ebro, mientras que los híbridos son competitivamente intermedios.

En el Alto Ebro los híbridos son más abundantes que las formas parentales; esto contradice lo que se esperaría que ocurriera atendiendo a las diferencias en la fecundidad, por lo que otro mecanismo ha de estar influyendo en el tamaño poblacional de las tres formas. Este mecanismo puede ser la mortalidad en las carreteras para los machos de *V. aspis* y las hembras de *V. latastei*, que puede estar relacionado con las habilidades térmicas y el uso del espacio durante las épocas reproductoras para los primeros, y el coste reproductor y el uso del espacio durante la gestación e hibernación en las segundas.

Se ha sugerido que las poblaciones de *V. aspis* del Norte están en expansión a expensas de las de *V. latastei*. Sin embargo, los resultados obtenidos para los rasgos reproductivos y demográficos sugieren la existencia de un equilibrio entre las dinámicas poblacionales de ambas especies.

La población híbrida

Parece que la selección endógena afecta a los híbridos provocando valores intermedios entre las formas parentales para los rasgos reproductivos. Sin embargo, los híbridos son muy abundantes y experimentan una baja mortalidad respecto a las poblaciones parentales, con lo que parecen tener un buen comportamiento en la zona híbrida. Además, parece existir un desequilibrio entre los sexos de las formas parentales, lo que podría estar favoreciendo las cópulas interespecíficas y ayudando a mantener la población híbrida. Sin embargo, la *fitness* de los genotipos híbridos y la distribución de la frecuencia de alelos en la zona híbrida necesita ser estudiada para testar estas hipótesis.

Conclusiones e investigaciones futuras

Las tres formas parecen competir intensamente por los recursos. Sin embargo, la segregación espacial y temporal podría estar reduciendo la competencia interespecífica y permitiendo la coexistencia. El uso diferencial de los recursos provoca la existencia de ventajas reproductivas y demográficas para *V. latastei* y los híbridos, respectivamente. La *fitness* reproductiva intermedia de los híbridos sugiere la ocurrencia de selección endógena. No obstante, son necesarios estudios térmicos y genéticos para elucidar los factores limitantes para las tres formas y establecer un modelo de zona híbrida.

Comparative ecological traits of two Mediterranean vipers in a hybrid zone: interspecific competition, niche segregation, and competitive advantages

Fernando Martínez-Freiría¹, Miguel Lizana¹, José Pedro do Amaral^{2,3}, José C. Brito⁴

¹ Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

² Western Kentucky University, Biology Department, Bowling Green, KY 42101, USA.

³ Centro de Biologia Ambiental, FCUL, Campo Grande C2, 1749-016 Lisboa, Portugal.

⁴ CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão, R. Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal.

Abstract

Mediterranean vipers are ecologically very similar. When in contact, they constitute an exceptional model to study the effects of competitive interactions and niche segregation mechanisms. In High Ebro, distinct methodologies (random visual encounter, road sampling and radio-tracking surveys, captive maintenance, standardized transects and ad hoc field observations) were used to compare ecological traits (diet, micro-habitat, activity, reproductive and demographic) of *V. aspis*, *V. latastei* and hybrids among both species and determine competitive advantages of each form. Diet preferences were similar but few differences were found in feeding frequency and annual variation in diet consumption. Males of the three forms compete for areas with similar characteristics but differences were found mainly during summer. Significant differences in average movement rates and home range size were found among males. Fecundity and new-borns fitness were lower in *V. aspis* than in *V. latastei*, whereas hybrids had intermediate values. Male and female adult hybrids were more abundant than parental forms, whereas female and juvenile *V. latastei* and juvenile hybrids had high road-mortality. The three forms seem to be competing intensely for resources but the segregation on the spatial and temporal axes of their niches could be reducing interspecific competition and allowing coexistence. The use of different resources probably confers reproductive and demographic advantages for *V. latastei* and hybrids, respectively. Moreover, reproductive fitness of hybrids suggests the occurrence of endogenous selection. Comparative thermal and genetic studies are needed to clarify the limiting factors of vipers and to establish a model of the hybrid zone.

Keywords: *Vipera*, diet, micro-habitat, activity, reproduction, demography, fitness, endogenous selection

Introduction

Among the different forms of species interactions, such as predation, parasitism, or detritivorism, interspecific competition and the mechanisms allowing coexistence between similar species have interested ecologists for a long time (Schoener, 1974). Interspecific competition may occur when two or more species with similar ecological requirements share the same area. If the resources are in short supply, one species may have lower fecundity, survival, or growth as a result of resources exploitation or interference caused by the other species (Begon, Harper and Townsend, 1999). Even when resources are not in short supply, one species may be outcompeted by the other according to the competitive exclusion principle (Gause, 1935). However, natural selection may favour ecological divergence among species in coexistence to minimize the intensity of interspecific competitive interactions. Therefore, species tend to differ in their ecological niches (Ricklefs, 1998). Differences in resource use could have repercussions on reproductive and demographic traits of species in competition (e.g. Clarke, 1992). These traits might confer competitive advantages for one of the species in detriment of the others, for they affect life history traits and thus the dynamics of populations (Clutton-Brock, 1990).

Only a few studies have addressed the effects of interspecific competition on reproductive and demographic traits (e.g. Cameron et al., 2007; Gröning and Hochkirch, 2008). However, a great amount of literature about niche requirements of competing species has been published for several taxa, reporting differences in three basic axes of the species niche: i) trophic, including differences in prey type (e.g. Labropoulou and Eleftheriou, 2005) or prey size (e.g. García and Arroyo, 2005); ii) spatial, including differences in habitat (e.g. Hart, 2003) or micro-habitat selection (e.g. Langkilde and Shine, 2004); iii) temporal, including daily (e.g. Holm and Edney, 1973) or seasonal differences (e.g. Schuett et al., 2005) in their activity patterns. Segregation may occur along any of these niche dimensions, or some combination of them (e.g. Loveridge and Macdonald, 2003), and thus allow resource partitioning and the ecological coexistence of species.

Closely related species are supposed to compete intensely for resources in areas where their distributions overlap. Because they are recent descendants of a common ancestor, their current niches are the product of niche divergence and should be much overlapped (Wiens and Graham, 2005). During the Quaternary ice ages, new species arose from the geographic separation of the ancestral species in isolated refugia. Currently, when these largely allopatric new species meet at the limits of their parapatric ranges, they are likely to display interspecific competition (Hewitt, 1996). Furthermore in contact zones, closely related species usually experience gene flow as a result of hybridization processes (Howard et al., 2003). Traditionally, natural hybridization has been interpreted as a mechanism to complete speciation processes (Mayr, 1963). In fact, the reinforcement

hypothesis predicts the development of pre-zygotic barriers for avoiding hybrids with reduced biological fitness when closely related species come into contact (reviewed by Servedio and Noor, 2003). Nevertheless, hybridization is also interpreted as a new genotype generator process, because from the combination of two parental genomes could result the foundation of new hybrid species, or as a mechanism allowing range expansion in unfavourable habitats, because introgression may lead to the transfer of adaptations from one taxon into another (Arnold, 1997; Burke and Arnold, 2001). In hybrid zones, interspecific competition among the different forms should be very strong and niche segregation should allow coexistence (e.g. Heller, 1971; Gannon and Rácz, 2006) and the hybrids to achieve isolation from parental species (Arnold, 1997, Burke and Arnold, 2001).

European vipers are a good model to study the effects of competitive interactions and niche segregation mechanisms in contact zones. These vipers are a monophyletic group that evolved during the Quaternary ice ages under a probable allopatric speciation process (Lenk et al., 2001; Garrigues et al., 2005) and, with the exception of the *ursinii* group, have similar ecological requirements (Saint-Girons, 1975a). Their current ranges are mostly parapatric, but there are several contact zones among distributions of the different species (Saint-Girons, 1980a) where interspecific competition has been suggested to play an important role (Saint-Girons, 1975b, 1980a; Duguy, Martínez-Rica and Saint-Girons, 1979; Bea, 1985; Monney, 1996; Luiselli, 2006; Luiselli, Filippi and Di Lena, 2007). Indeed, studies carried out in contact zones have reported spatial niche segregation among species in contact zones (Saint-Girons, 1975b; Duguy, Martínez-Rica and Saint-Girons, 1979; Bea, 1985; Monney, 1996; Brito and Crespo, 2002; Luiselli, 2006; Luiselli, Filippi and Di Lena, 2007). However quantitative studies were only developed in contact zones among phylogenetically distant species (e.g. Saint-Girons, 1975b; Monney, 1996; Brito and Crespo, 2002; Luiselli, Filippi and Di Lena, 2007), thus the role of interspecific competition and niche segregation mechanisms on closely related species, that could be interbreeding, is still unknown.

In the Iberian Peninsula there are three parapatric viper species, two sibling Mediterranean, *V. aspis* and *V. latastei*, and one phylogenetically distant Euro-Siberian, *V. seoanei* (Lenk et al. 2001; Garrigues et al. 2005), which have several contact zones along their distribution areas. An allopatric distribution pattern at regional scale is found for the phylogenetically distantly-related pairs, *aspis-seoanei* and *latastei-seoanei*, whereas sympatry was suggested for the closely-related *aspis-latastei* in six areas of the Iberian Peninsula (Martínez-Freiría et al., 2009). In one of them, the high course of Ebro river (hereafter High Ebro), sympatry was observed in an area of 8 km² along the middle course of the rivers Rudrón and Sedanillo (Martínez-Freiría, Brito and Lizana, 2006a) and ecological niche-based models identified a gradual transitional environmental area of 76 km²

where *V. aspis* and *V. latastei* could potentially be found together (Martínez-Freiría et al. 2008). Both species converge morphologically and specimens with intermediate characteristics were found in the sympatry area (Martínez-Freiría, Brito and Lizana, 2006a; Martínez-Freiría et al., 2009). Analyses of microsatellite variation in 210 specimens revealed the existence of gene flow between both species and that morphologically intermediate vipers correspond mostly to hybrids (authors, unpublished data). Moreover, cannibalism among vipers was detected (Martínez-Freiría, Brito and Lizana, 2006b), an aberrant behaviour in European vipers, which suggests the occurrence of strong competitive interactions.

In this study, the ecological traits of *V. aspis*, *V. latastei*, and hybrids will be investigated in the contact zone of High Ebro under the scenarios of interspecific competition and niche segregation. The aims of this study are the comparison of: 1) diet preferences (composition and annual variation, feeding frequency and trophic niche breadth and overlap), 2) micro-habitat use (item preferences by season), 3) activity patterns (% of active individuals, actual movement rate and home range size for males), 4) reproductive traits (fecundity, reproductive effort, biometry, mortality and moulting traits of new-borns, and frequency of reproduction), and 5) demographic traits (relative abundance and mortality) of vipers. Diet preferences, micro-habitat use, and activity patterns will determine niche preferences, where similarities among the three viper forms will show that resources are under competition and differences will show that resources are being segregated. Reproductive and demographic traits will provide information about population dynamics and competitive advantages among the three different forms. Moreover, reproductive and demographic traits of hybrids will allow inferring their performance in the hybrid zone.

Material and methods

Study area

The study was conducted in the hybrid zone among *V. aspis* and *V. latastei* of the High course of Ebro river in northern Spain (Fig. 1) (latitude: N42° 37.7' to N42° 58.7'; longitude: W3° 37.3' to W3° 58.5'). The area coincides with the transition between Euro-Siberian and Mediterranean regions, and consists of flat calcareous plateaus with deep valleys and steep canyons excavated by the Ebro River and its tributaries Rudrón and Sedanillo Rivers. Altitude ranges from 621 to 1150 m.a.s.l. Climate is sub-humid Mediterranean with Central European tendency. Average annual precipitation ranges from 697 to 829 mm/year and average annual temperature ranges from 22.2 to 24.8°C (Hijmans et al., 2005). The most representative bioclimatic stage is the Supra-Mediterranean but there are also elements of the Mountain stage of the Euro-Siberian region (for details see Martínez-Freiría, Brito and Lizana, 2006a).

Field data

Data for this study were obtained through a combination of six distinct methodologies: 1) Random visual encounter surveys, performed throughout the study area between March 2004 and October 2007. Vipers were captured by hand, photographed, counted for pholidosis, measured (mm), weighed, sexed, checked for sexual condition, and forced to defecate. Stomach contents in live specimens were detected by palpation and vipers were not forced to regurgitate, with the exception of some accidental cases. A total of 303 specimens were used to study reproductive and diet traits. 2) Road sampling surveys, performed throughout the study area between March 2004 and October 2007. Road-killed vipers were photographed, counted for pholidosis, measured, sexed, and checked for sexual condition before dissection, in which digestive and reproductive organs, and embryos in the case of pregnant females, were extracted. Embryos were also counted for pholidosis, measured, and weighed. A total of 158 specimens were used to study reproduction, mortality, and diet traits. 3) Captive maintenance of pregnant females, performed during the last 20 days of gestation at controlled conditions in glass terrariums (560x300x300 mm). A total of 13 pregnant females were measured and weighed before and after giving birth. Date of parturition was noted and newborns were photographed, counted for pholidosis, measured, and weighed. New-borns were retained in captivity under controlled temperature and humidity conditions during the two days after birth. Data were used to study fecundity, biometric and moulting traits of new-borns. 4) Standardized transects, performed in five areas of the central part of the sympatry area (total length of 18.85 km) from March to October 2005 (avg. 4.05 transects by month). A total of 108 specimens were individually identified by clipping a unique combination of ventral scales (Blanchard and Finster, 1933) and used to determine the relative abundance of each of the three forms. 5) Radio-tracking surveys, performed on ten adult males (SVL between 440 and 505 mm) in the sympatry area from February 2006 to June 2007. Places occupied by these males were used to study microhabitat selection and activity patterns. 6) Ad hoc field observations, collected from March 2004 to October 2007, included assorted behaviours such as mating and other reproductive behaviours (male combats or mate guarding), microhabitat use, and time of mating, gestation, hibernation, and moulting. These observations were used to complement data on reproductive, microhabitat, and activity patterns for the three forms.

Specimens were classified as *V. aspis*, *V. latastei*, or hybrids between both species according to a combination of morphological characters and analyses of microsatellite variation (authors; unpublished data). The morphological characters included snout elevation, number of apical scales, shape of the dorsal stripe, and number of dorsal markings (see Martínez-Freiria, Brito and Lizana, 2006a for details). Total dataset accounted 188 *V. aspis* (83 females and 105 males), 180 *V.*

latastei (75 females and 105 males), and 93 hybrids (40 females and 53 males) (Table 1).

Radio-transmitters implantation

Two types of radio-transmitters were used: 3 Model PD-2 and 7 Model Holohil PD-2H, Holohil Systems Ltd. (Carp, Canada). Each model weighed 4 and 3 g, respectively, and represented on average 3.99% (range = 2.97–4.69%) of the vipers' body mass. Subcutaneous surgical implantation followed the procedures described by Weatherhead and Anderka (1984). Transmitters had a frequency range of 149.000–149.999 MHz and each type a battery life of 32 and 24 weeks, respectively.

Males were monitored between February 2006 and June 2007, which gave a total of 1669 observations: 629 for four males of *V. aspis*, 488 for three males of *V. latastei*, and 552 for three males of hybrids. Average length of monitoring was 5.5 months for *V. aspis* (range=4–8), 5.3 months for *V. latastei* (range=4–6) and 7.5 months for hybrids (range=6–9). Males were located on average 10.8 days per month (range 1–23) between 0600 and 2100, and three times a day (range 1–6), with a minimum interval of two hours between consecutive locations. To minimize disturbing the vipers, they were located at a reasonable distance and their behaviour recorded without disturbing them. Nevertheless, they were captured at least once per month to inspect their condition.

Diet preferences analyses

Whenever possible, undigested contents from vipers' stomachs and intestines were classified at the species level using identification keys (e.g. Teerink, 1991; Salvador, 1997). However, scales from lizards and hair from mammals have low morphological variation in species of the same genus, thus the determination at the species level of prey from the digestive tract was not possible for certain pairs of species with sympatric distributions in the study area. Such pairs included *Chalcides spp.*, *Podarcis spp.*, *Coronella spp.*, and *Vipera spp.* in the case of reptiles (Pleguezuelos, Márquez and Lizana, 2002), and *Sorex spp.*, *Microtus spp.*, and *Apodemus spp.* in the case of mammals (Palomo and Gisbert, 2002). Prey were pooled in four categories: Invertebrates, Reptiles, Mammals-Soricomorpha, and Mammals-Rodentia.

Sexual and ontogenetic differences in diet composition were tested. Ontogenetic changes after 300 mm of snout-vent length (SVL) are common in *V. aspis* and *V. latastei* (Saint-Girons, 1980b; Luiselli and Agrimi, 1991; Santos et al., 2007). Data from dissected specimens from High Ebro suggested that sexual maturation is attained at this size (see below Reproductive traits analyses). Therefore, specimens were analysed with a separation between sexually immature and mature specimens (>300 mm SVL). Analyses among forms were done using χ^2 tests diet composition

comparisons, annual variation, and feeding frequency. Trophic niche breadth and overlap were determined using Levin's and Pianka's indices, respectively.

Microhabitat selection analyses

Microhabitat selection was inferred from the radio-tracked males (four *V. aspis*, three *V. latastei* and three hybrids). A total of 297 independent presence locations were recorded (except during the winter), of which 109 for *V. aspis*, 90 for *V. latastei*, and 98 for hybrids. It was also recorded the same amount of absence locations for the three forms, in places where specimens were never found. At each presence or absence locality, an area of 9m² was delimited and characterised with six uncorrelated variables (Pearson's $r < 0.25$ in all cases): slope, % of bare soil, % of rocks, % of moss and substrate covering vegetation, % of bushes, and % of trees. Locations were grouped by form and season and then analysed using logistic regression through a forward stepwise process (F to enter = 0.05). 75% and 25% of localities were used as training and test datasets, respectively. Models were validated using the Area Under the Curve (AUC) of a Receiver-operating curve (Liu et al., 2005).

Activity patterns analyses

Three indicators of activity were used: 1) % of active males. Vipers were considered as active when they were seen above the ground and not active when they were under rocks, in holes or inside dense bushes (Brito, 2003); 2) actual movement rate (AMR) for males was calculated as the sum of the distances moved divided by the number of days of movement occurred in each interval; 3) home range size for males was calculated with KERNEL estimator (95% of probability) (Seaman and Powell, 1996). AMR and home range were estimated with Home Range Tools version 1.1 for ArcGis 9.2 software. Comparisons between forms were performed using χ^2 tests.

Reproductive traits analyses

Because of the small sample size of males, statistical tests were done only for the new-born individuals and for the females. Potential fecundity was determined counting the number of enlarged follicles (> 10 mm in diameter; Pleguezuelos et al., 2007), and calculating the average number of enlarged follicles in roadkilled females. Effective fecundity was determined as the average number of neonates by offspring and reproductive effort as the ratio of total offspring body mass over body mass of the female just after parturition. Dissected roadkilled and captive pregnant females datasets were used for calculating both fecundity parameters, and also for estimating the smallest size for reproduction by noting the smallest females with enlarged follicles or embryos.

Biometry, mortality, and moulting traits of newborns were determined using only data from captive pregnant females. Biometric traits included comparisons of SVL and body mass. Mortality of newborns was calculated as the number of stillborns (NSB) after parturition. Moulting characteristics included comparisons regarding the number of moulted newborns after parturition (NMAP) and number of newborns with fragments of ancient skin after moult (NWFS). Usually, newborns immediately moult after birth, but occasionally they spend several days without moulting or maintaining fragments of the ancient skin (FMF, personal observation). Under controlled captivity conditions (temperature and humidity), abnormalities in moulting process, the maintenance of the ancient skin or fragments can be due to internal diseases in snakes, such as thyroid hypertrophy (AH-USA, 2009). Therefore, it was used as an indicator of the fitness of new-borns. Newborns were analysed grouped by litter and by form; comparisons were developed using one-way ANOVA analyses.

Frequency of reproduction was determined by calculating the proportion of captured and road-killed reproductive females by total adult females by year. χ^2 tests were performed among forms by years and by combining all years. Meteorological data (average precipitation, average temperature, average maximum temperature and average minimum temperature) for years 2003, 2004, and 2005 from adjacent meteorological stations (AEMET, 2008) were analysed with χ^2 tests to evaluate relationships between variation among years in climate and proportion of reproductive females.

Demographic traits analyses

The relative abundance of vipers in the area of sympatry was compared using χ^2 tests by form, sex, and age. Mortality rates were estimated from a small section of 3.62 km located in the surroundings of the standardised transects. There were no significant differences ($\chi^2 = 0.579$, $P < 0.05$) in the number of roadkill vipers by year and form for this section, thus all data were pooled. Comparisons among roadkill vipers were performed using χ^2 tests by form, sex, and age.

Results

Diet preferences

There were no significant differences in diet composition between sexes of the same form, thus data for males and females were pooled. Comparing the three forms, there were no significant differences in diet composition when all specimens and only mature specimens were analysed (Table 1). The Levin's index was relatively low (< 0.440) and the Pianka's index was high (> 0.933) for all forms (Table 1).

Feeding frequency was not significantly different among the three forms, but it was signifi-

cantly different when *V. aspis* and hybrids were compared, being higher for the latter. Annual variation in diet composition was not significantly different among seasons for each form and among the three forms by season. However, there were trends for seasonal differences in prey consumption: reptiles were mainly preyed upon in the summer by *V. aspis* and in the spring by *V. latastei* and hybrids, whereas Soricomorpha mammals were mostly consumed in the spring by parental species and in the summer and autumn by hybrids (Table 1); 2) *V. aspis* preyed more frequently upon Rodentia mammals in the summer and autumn than the other forms; 3) The main feeding season for *V. aspis* and *V. latastei* occurred in the summer and the spring, respectively. Observed feeding period was one and two months longer in *V. aspis* than in *V. latastei* and hybrids, respectively (Table 1).

Microhabitat selection

Logistic regression models had high AUC (> 0.890) and correct classification rates of training samples ($> 82\%$) but lower correct classification of test samples ($> 57\%$), indicating high accuracy but limited prediction capacity (Table 1). Models identify % of bushes, % of rocks and % of trees as significantly related to the microhabitats selected by male vipers (Table 1). Two of them, % of bushes and % of rocks, were influenced the selection of the three forms: males of all forms compete for areas with high amount of rocks in the spring and bushes in the summer and autumn. Moreover, several variables were related to the microhabitats selected by pairs of forms by season: 1) *V. aspis* and *V. latastei* selected areas with high amount of bushes in the spring and high slopes in the autumn; 2) *V. aspis* and hybrids selected areas with high amount of trees in summer; 3) *V. latastei* and hybrids selected areas with high amount of trees in spring. However, there were specific differences in microhabitat selection among males by season: 1) in the spring *V. latastei* selected areas with lower slope; 2) in the summer *V. aspis* used areas with high percentage of rock cover, *V. latastei* with mosses and hybrids with bare soil; 3) in the autumn *V. aspis* and hybrids occurred in areas with high percentage of tree and rock cover, respectively.

Moreover, field observations suggested the use of different places for hibernation and female's gestation. *V. aspis* was recorded hibernating in cooler places, with denser vegetation, closer to rivers or other humid areas than *V. latastei*, whereas the hybrids hibernated in places with intermediate characteristics. However, a hibernaculum with specimens of the three forms was found and consisted of a large crack in rock with sparse vegetation, located in the base of the plateau at 830 m of altitude. Gestation places for female *V. aspis* were also cooler than those used by female *V. latastei*, whereas hybrid reproductive females were found in places with intermediate characteristics.

Activity patterns

There were no significant differences among percentages of active males of the three forms. However, there was a trend for a shorter period of activity in male *V. aspis* (Table 1). Both radio-tracking and field observations at the beginning and end of the active season suggested that male *V. aspis* had a larger period of hibernation than *V. latastei* and hybrid males. Although there were no significant differences in the percentage of active males, males of *V. latastei* were mostly inactive during the summer (Table 1); this was further corroborated by field observations.

There were significant differences in average actual movement rates (AMR) among males of three forms ($\chi^2 = 104.37$, d.f. = 10, $P = 0.001$). *V. aspis* and *V. latastei* had high AMR in March-April and a second peak in September-October, which was the highest for hybrids (Fig. 1). *V. latastei* apparently does not move in July-August. Both *V. latastei* and hybrids exhibited low AMR in January-February and November-December, respectively.

There were significant differences in average home range size ($\chi^2 = 20718.43$, d.f. = 8, $P = 0.001$) among males of three forms throughout the annual cycle (Fig. 2). The three forms exhibited peaks in the spring and autumn, but home range size oscillated throughout the year according to forms: 1) the largest sizes occurred in May-June for *V. latastei* but in September-October for *V. aspis* and hybrids; 2) relatively high values were observed in January-February and November-December in *V. latastei* and hybrids, respectively.

Similar moulting periods were detected for 147 and 161 adult females and males, respectively (Table 1). Moulting periods for males occur earlier in spring and later in summer-autumn than moulting periods for females.

Figure 1. Actual movement rate (AMR) by two month periods for males of *V. aspis*, *V. latastei* and hybrids in the High Ebro.

Figure 2. Home range sizes by two month periods for males of *V. aspis*, *V. latastei* and hybrids in the High Ebro.

Reproductive traits

Mating and copulatory behaviours were detected in the spring for the three forms (Table 1). However, hybrid, interspecific, and hybrid-parental species pairs of males and females were also detected during September and October, which suggested the occurrence of an autumn mating season for the three forms. Estimated minimum sexual maturation was smaller in both males and females of *V. aspis* and *V. latastei* but larger for hybrids (Table 1). Date of parturition was similar among the three forms (Table 1), occurring in late summer.

Potential and effective fecundity were different among *V. aspis* and *V. latastei*, producing the latter more follicles and embryos. The number of follicles and embryos of hybrids was smaller than of *V. latastei* and *V. aspis*, respectively (Table 1). Reproductive effort of *V. latastei* and hybrids was similar and higher than in *V. aspis*. Analyses of the 10th percentile superior of female's SVL shows that differences in fecundity and reproductive effort between forms are not size related ($\chi^2=0.26$, d.f.=4, $P=0.992$).

Significant differences in new-borns traits were only obtained when new-borns biometric, mortality, and moulting traits were analysed pooled by form, without differing among litters. There were significant differences in new-borns SVL's of each form: *V. aspis* were larger and heavier than *V. latastei* whereas hybrids were intermediate. There were also significant differences concerning mortality and moulting traits of new-borns: *V. aspis* had the lowest NSB and highest NWFS, *V. latastei* had the highest NSB and NMAP and hybrids had the lowest NMAP (Table 1). There were significant differences in the proportion of reproductive females by form among years but no significant differences among each form in each year (Table 1). Therefore, reproductive

cycles were similar among forms but variable among years. Significant differences ($\chi^2 > 41.69$, d.f.=22, $P < 0.05$) were found on average temperature and maximum temperature for the period 2003–2005. 2003 was exceptionally warmer and that should have allowed a shorter hibernation period for the vipers. The average of the proportion of reproductive females for the three years ranged between 30 to 40%, which indicates a triennial reproductive cycle for the three forms.

Demographic traits

The relative abundance of forms by sexes and ages in the field was significantly different ($\chi^2 = 9.54$, d.f.= 4, $P < 0.05$): both male and female adult hybrids were more abundant than parental forms in the central part of the contact zone (Fig. 3), whereas the most abundant juveniles were of *V. latastei*. There was a trend for overall significant differences in road mortality among the three forms ($\chi^2 = 9.42$, d.f.= 4, $P = 0.051$): female and juvenile *V. latastei* and juvenile hybrids had high road-mortality (Fig. 3).

Figure 3. Kilometric indexes of abundance and road-mortality for females, males and juveniles of *V. aspis*, *V. latastei* and hybrids in the central region of the contact zone of High Ebro.

Discussion

This work showed some preliminary patterns about the ecology of *V. aspis*, *V. latastei*, and hybrids in the contact zone of the High Ebro. Similarities in diet and microhabitat preferences of the three forms show that interspecific competition has a major role in the dynamics of this hybrid zone. Differences in microhabitat use and activity patterns suggest the occurrence of niche segregation in spatial and temporal axes which should be relaxing competitive interactions among vipers. Nevertheless, differences in resource use could be apparently affecting fecundity, abundance, and mortality traits that should confer competitive advantages for one of the forms. Moreover, the hybrid population is well established as their reproductive fitness and performance show.

Interspecific competition and niche partitioning

Closely related species usually have similar ecological niches, thus interspecific competition should occur when they meet in contact (Wiens and Graham, 2005). At the High Ebro, the occurrence of interspecific competition was confirmed for the studied vipers mostly share the same prey and microhabitat preferences.

Diet partitioning is the most common mechanism for competition avoidance in many closely related species in contact (e.g. García and Arroyo, 2005), which includes many snake species (Vitt, 1987; Luiselli, 2006). However, this is not the case among European vipers that have the same diet preferences, primarily preying upon micromammals and secondarily upon reptiles (Saint-Girons, 1980b; Luiselli and Agrimi, 1991; Bea et al., 1992; Brito, 2004; Santos et al., 2007; Canova and Gentilli, 2008), even when they meet in contact (Saint-Girons, 1975b; Monney, 1996). Basically, they appear to prey on the most abundant prey available (Luiselli, 2006). Vipers from High Ebro follow the same pattern, having similar diet composition and presenting a total overlap of their trophic niches. In fact, prey availability studies confirm that the three forms mainly take the most abundant prey available: *Apodemus* mice (Lamosa, Martínez-Freiría and Pardavila, unpublished data). Therefore, the three forms are competing intensely for the same prey items, but three factors could be minimizing competition: 1) the great density of micromammals found in the area of sympatry in contrast with the allopatric areas (Lamosa, Martínez-Freiría and Pardavila, unpublished data). Furthermore, similar results were reported between sympatric *V. aspis* and *V. berus* in Switzerland (Monney, 1996): syntopy is possible in an area with a high density of micromammals. Therefore, if prey is not scarce, interspecific competition would be reduced; 2) differences in the timing for eating. In the High Ebro, the duration of the feeding period and the feeding frequency among vipers were quite different: *V. aspis* had the longest feeding period and the lowest feeding frequency, whereas hybrids had the shortest feeding period and the highest feeding

frequency and *V. latastei* have intermediate values for both feeding period and frequency. Moreover, the main feeding season was different among forms: *V. aspis* and *V. latastei* consume nearly 50% of their preys in the summer and spring, respectively, whereas hybrids consume the same amount of prey in the two seasons. In France, similar results were found among *V. aspis* and *V. berus* in the sympatry area of the Atlantic Loire (Saint-Girons, 1975b). These differences could be allowing temporal diet partitioning, and thus reducing interspecific competition; 3) a trend for *V. aspis* being specialized in rodents. Particular differences in prey consumption were also reported in sympatric *V. aspis* and *V. berus* (Saint-Girons, 1975b). At the High Ebro, differences in prey consumption are noticeable when the annual variation in prey consumption is considered and probably is related to differences in prey availability in the microhabitats used throughout the annual cycle (e.g. Brito, 2003, 2004; Agrimi and Luiselli, 1992). Therefore, at the High Ebro competition on the trophic axes should be very strong, for the three forms consume the same prey. However, prey abundance and some degree of diet partitioning thorough the annual cycle could reduce competitive interactions.

Microhabitat selection has been confirmed as the major axis for niche partitioning among European vipers in contact (Luiselli, 2006). For example, *V. aspis* use warmer and dryer microhabitats than *V. berus* in French and Swiss contact zones (Saint-Girons, 1975b; Monney, 1996). In the Pyrenees, similar results were reported in the Spanish contact zone among *V. aspis* and *V. latastei*: the former occurred in humid micro-habitats, north exposed, whereas the latter occurred in south-facing dry microhabitats (Duguy, Martínez-Rica and Saint-Girons, 1979). In contact zones, different microhabitat selection has been referred as due to the different thermal needs and thermoregulatory abilities of the species, but also as mediated by interspecific competition (Saint-Girons, 1975a, 1978, 1980a; Duguy, Martínez-Rica and Saint-Girons, 1979). Out-competition from a determinate spot through interference competition has been documented in many species of reptiles (e.g. Langkilde and Shine, 2004) and mutual exclusion was referred as occurring among European vipers in contact zones (Duguy, Martínez-Rica and Saint-Girons, 1979; Saint-Girons, 1975b, 1980a; Bea, 1985). At the High Ebro, the three forms select similar items each season, thus there should be a strong competition for places with the same characteristics. Moreover, the observation of cannibalistic behaviours in *V. latastei* in captivity conditions (Martinez-Freiria, Brito and Lizana, 2006b) and the detection of fragments of vipers in gut contents of parental species (Table 1), suggest the occurrence of out-competition. Therefore, interference competition could let out-competed vipers use different microhabitats. In fact, at the High Ebro there are microhabitat components that are selected only by one of the forms per season. For example, during the summer, which is the main feeding period for vipers (Bea et al., 1992; Brito, 2004), microhabitat selection

is quite different: *V. aspis* selects warmer (with rocks) microhabitats than those used by *V. latastei* (with moss), whereas microhabitats selected by the hybrids are intermediate (with soil). Male *V. aspis* and *V. latastei* in allopatry were reported using fresh microhabitats during the summer (Moser, Graber and Freyvogel, 1984; Naulleau, Duguy and Saint-Girons, 1998; Brito, 2003). At the High Ebro, sympatric male *V. aspis* are apparently out-competed to suboptimal microhabitats by the other forms. Moreover, field observations suggest the use of places with different characteristics for some crucial periods such as hibernation or females' gestation. Furthermore, these places are distinct from those used in areas of allopatry. For example, in the allopatric range of *V. aspis* in the High Ebro, pregnant females were detected in warmer places with low vegetation (authors, personal observation), whereas in the sympatry area pregnant females were only detected in cool places with dense vegetation. However, both in allopatry and sympatry, pregnant females of *V. latastei* were detected during gestation in warmer places with low vegetation (authors, personal observation). This suggests that in sympatry, female *V. aspis* are out-competed to suboptimal places by the other forms. Therefore, interspecific competition seems to be leading to spatial partitioning among vipers at the High Ebro, which seems to be causing the use of sub-optimal places in *V. aspis*. Nevertheless, thermoregulation studies are needed to determine thermal characteristics of the places used by the different viper forms.

Activity is the third niche axis in which similar ecological species in contact could differ to avoid competition (Ricklefs, 1998) and even interbreeding (Schuett et al., 2005). Studies in contact zones between *V. aspis* and *V. berus* have reported differences in the duration of the activity period and in the time for mating (Saint-Girons, 1975b; Monney, 1996). However, considering that the species were at the limits of their extent of occurrence, these differences could also be due to different thermal needs and thermoregulation abilities (Saint-Girons, 1975a,b, 1978; Monney, 1996), instead of interspecific competition. At the High Ebro, the duration of the hibernation period is quite different among forms, being larger in *V. aspis* than in *V. latastei* and hybrids. Moreover, male movement rates and home range sizes increased in the spring and autumn, which coincide exactly with the two mating periods reported for *V. aspis* and *V. latastei* (Saint-Girons, 1957, 1992; Brito, 2003; Pleguezuelos et al., 2007). At these times, males cover large distances searching for females to mate, thus increasing their home ranges (Naulleau, Duguy and Saint-Girons, 1998; Bonnet, Naulleau and Shine, 1999; Brito, 2003). In allopatric populations, the mating period for *V. aspis* occurs predominantly in the spring and secondly in autumn, whereas for *V. latastei* occurs mainly in the autumn (Saint-Girons, 1957, 1992; Moser, Graber and Freyvogel, 1984; Brito, 2003; Pleguezuelos et al., 2007). At the High Ebro, field observations detected the occurrence of a spring mating period and suggested the occurrence of an autumn mating period

for the three forms; interspecific couples were also found at these times (Martínez-Freiría, Brito and Lizana, 2006a). However, home ranges estimates for males suggest different periods for mating: *V. aspis* and hybrids mainly should mate in the autumn, whereas *V. latastei* in the spring. Moreover, the values for the home range estimates at these times were different among the three viper forms and that could be mediated by interference competition. Therefore, vipers from the High Ebro probably mate in the spring and the autumn, but the use of space during mating periods is different among forms, which could reduce the occurrence of interspecific matings. Nevertheless, the role of interspecific competition in temporal niche segregation remains unclear because the thermal requirements of the three forms are unknown.

Competitive advantages

Differences in resources use should have repercussions on reproductive and demographic traits of species in competition. Such differences may confer competitive advantages for one of the species in detriment of the others, for they affect life history traits and thus the dynamics of populations (Clutton-Brock, 1990). In fact, such differences have been reported among phylogenetically distant *V. aspis* and *V. berus* in the French Atlantic-Loire and Swiss pre-Alps contact zones: *V. berus* reproduces more frequently but is more vulnerable to predation than *V. aspis*, which influences population dynamics in both contact zones (Saint-Girons, 1975b; Monney, 1996). At the High Ebro, all forms exhibit dietary differences but clearly segregate their spatial and temporal niches. Therefore, differences in reproductive and demographic traits of vipers could be due to these niche differences.

Higher reproductive success may confer competitive advantage for one of the forms because it affects population size (Clutton-Brock, 1990). At the High Ebro, differences were found between *V. aspis* and *V. latastei* in the number, body mass, and body size of newborns. *V. aspis* produces fewer but larger and heavier newborns per litter than *V. latastei*, whereas hybrids have intermediate values for these traits. These differences probably are not related to phylogenetically different reproductive strategies, given that opposing patterns were reported in allopatric populations of *V. aspis* and *V. latastei*. Both of these species have similar fecundity and newborns of *V. latastei* are larger and heavier than those of *V. aspis* (Saint-Girons and Naulleau, 1981; Pleguezuelos et al., 2007). Therefore, differences in fecundity traits among allopatric and sympatric (High Ebro) populations could be due to distinct use of resources that may be mediated by interspecific competition. For instance, optimal thermoregulatory conditions during gestation affect pregnant female's output (Lourdais et al., 2004), thus higher mortality rates or diseases in new-borns could be due to the use of suboptimal thermoregulatory spots by females during pregnancy. At the High

Ebro significant differences in mortality between forms and moulting traits of new-borns. *V. aspis* had more stillborn per litter and more newborns without moulting or maintaining fragments of ancient skin after parturition than *V. latastei*. Hybrids usually have intermediate values for these traits. Therefore, out-competition from optimal places could be promoting the use of sub-optimal thermoregulatory spots during pregnancy of *V. aspis* and hybrid females, and affecting their litters. Therefore, attending reproductive success of vipers from the High Ebro, *V. aspis* is apparently less competitive than *V. latastei* and hybrids are more competitive than *V. aspis* and less than *V. latastei*.

Differences in abundance and mortality may confer competitive advantages for one of the forms because they affect lifetime reproductive success (Clutton-Brock, 1990). At the High Ebro, there were significant differences in the abundance of the three forms: hybrids were more abundant than the parental forms. However, it contradicts results from fecundity, in which *V. latastei* should be the most abundant form, suggesting that other mechanisms influence population size of each form. Indeed, roadmortality is higher for male *V. aspis* and female *V. latastei* than for hybrids. Mortality on roads can be used as an excellent indicator of predation risk because snakes are more vulnerable to predators (including natural and anthropogenic) when they travel outside their normal home range (Bonnet, Naulleau and Shine, 1999). Differences in mortality due to thermoregulation abilities of *V. aspis* and *V. berus* were reported for the Atlantic Loire (Saint-Girons, 1975b). At the High Ebro, the periods of high mortality detected may be related to mating periods in males. During the mating season, the search for females increases the vulnerability of males to predation (Bonnet, Naulleau and Shine, 1999). In the study area, higher mortality period for males of *V. aspis* occur in the autumn when they increase their home ranges due to mating activities. Therefore, distinct thermal conditions and abilities, and differences in the use of space during mating periods could be related to different mortality rates of males.

Feeding after reproduction is essential for females because they invest body fat reserves on reproduction and during gestation they eat relatively little, and some may become completely anorexic (Saint-Girons, 1957). Females of European vipers are capital breeders, i.e. females need to accumulate body fat reserves to reach reproductive status (Bonnet et al., 1999). Consequently, reproduction costs, i.e. how female's investment on reproduction (FIR) affects their survival, have to be determined after parturition and also during the time expended to reach again the reproductive status (Bonnet et al., 1999). Body condition index (length-mass relationship) is a valid indicator of previous food intake rate and the size of energy reserves in snakes (Bonnet and Naulleau, 1994) and is associated with both costs and benefits that may influence mortality after reproduction. At the High Ebro, major mortality periods for female *V. latastei* correspond to late spring and

late summer, during which they move away from their hibernation and gestation places to feeding areas (authors, personal observation). Body condition indices for most of roadkilled females were very low, which indicate that they were reproductive during the previous year in the case of roadkilled females in late spring, or the present year in the case of roadkilled females in late summer. Despite the intermediate FIR of *V. latastei*, costs of reproduction in this form should be the highest due to high mortality of post-reproductive females. Probably, investments on reproduction, but also selection of gestation places and hibernation periods, might be affecting mortality rates of female *V. latastei*.

It was suggested that populations of *V. latastei* are contracting while *V. aspis* is expanding in northern Iberian Peninsula, due to interspecific competition (Pleguezuelos and Santos, 2002). However, the low reproductive success of *V. aspis* at the High Ebro suggests that it should not be able to expand southwards because it is less competitive than *V. latastei* and even the hybrid forms. Contrarily, the high female mortality of *V. latastei* suggests that it should not be able to expand northwards because it is less competitive than the other forms. Therefore, both reproductive and demographic differences suggest equilibrium among the population dynamics of *V. aspis* and *V. latastei* at the High Ebro.

Hybrid population

Endogenous selection (or environmental independent) is the major force implicated in the formation of tension zones (Barton and Hewitt, 1985), which is the most common model of hybrid zones (Arnold, 1997; Burke and Arnold, 2001). Endogenous selection is due to chromosomal structural differences and recombination in hybrid genotypes (Arnold, 1997) and could result in lowered viability or fertility of hybrids (e.g. Barton and Hewitt, 1985; Szymura and Barton, 1991). Little is known about hybridization and selection mechanisms in contact zones among European vipers. The known cases of fertile hybrids between European vipers come from captivity where reproduction was forced (e.g. *V. ammodytes* x *V. aspis*, Obermayer, 1967; *V. aspis* x *V. seoanei*, Saint-Girons, 1990a,b). Natural hybridization in contact zones among European vipers is anecdotal (Saint-Girons, 1975b, 1980a; Monney, 1996) but the existence of specimens with intermediate morphological traits in contact zones suggests the occurrence of hybridization (Zuffi et al., 2001; Brito et al., 2008). At the High Ebro, hybrids have intermediate values for reproductive traits but higher and lower for abundance and mortality than parental forms, respectively. Moreover, the high mortality rates for male *V. aspis* and female *V. latastei* suggests the occurrence of disequilibrium among sexes of parental forms, which could be favouring interspecific mates. Therefore, interspecific mates could be maintaining the hybrid population, which have an intermediate

reproductive fitness but a good performance in the hybrid zone. Nevertheless, fitness of hybrid genotypes and allele frequencies distributions in the hybrid zone need further study to test these hypotheses.

Conclusions and future research

This study's combination of different methodologies was appropriate to infer the ecological patterns of vipers from the High Ebro. In this hybrid zone, *V. aspis*, *V. latastei*, and hybrids seem to be competing intensely for resources. However, partition on the spatial and temporal axes of their niches could be reducing interspecific competition and allowing coexistence. The use of different resources might be mediated by inference competition, conferring reproductive and demographic advantages for *V. latastei* and hybrids, respectively. Reproductive fitness of hybrids is an intermediate between those of the two parent species, which suggest the occurrence of endogenous selection. Nevertheless comparative thermal and genetic studies are needed to elucidate the limiting factors for the three forms and to establish a model of the hybrid zone.

Acknowledgements

This study was partially supported by project POCTI/BIA-BDE/55596/2004 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal). FMF was supported by a PhD grant (AP2003-2633) from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). JPA was in receipt of a fellowship from Fundação para a Ciência e a Tecnologia SFRH/BPD/3514/2000(Portugal), and a SYNTHESYS project (ES-TAF-1251) (Spain). JCB has a contract (Programme Ciência 2007) from FCT (Portugal). Authors acknowledge “Asociación Sociocultural Hoces del Alto Ebro y Rudrón” (Burgos, Spain), A. Lamosa and X. Pardavila for developing prey availability studies, and also friends who helped with the field work at the High Ebro.

	<i>V. aspis</i>	n	<i>V. latastei</i>	n	Hybrids	n
Diet preferences		181		172		85
Composition (%)		37		48		28
Mollusca	0		2.17		3.57	
Coleoptera	0		4.35		0	
Invertebrates	0		4.17		3.57	
<i>Chalcides</i>	5.41		6.52		14.29	
<i>Podarcis</i>	0		2.17		0	
<i>Coronella</i>	0		2.17		0	
<i>Vipera</i>	2.7		2.17		0	
Reptiles	8.11		14.58		10.71	
<i>Sorex</i>	8.11		13.04		10.71	
<i>Crocidura</i>	8.11		15.22		14.29	
Soricomorpha	16.22		20.83		17.86	
<i>Microtus</i>	43.24		32.61		42.86	
<i>Apodemus</i>	32.43		17.39		25	
Rodentia	75.68		60.42		67.86	
Mammals	91.89		81.25		85.71	
Niche breadth						
Levin's index	0.22		0.44		0.33	
Niche overlap						
Pianka' index						
<i>V. aspis</i>	-		0.93		0.99	
<i>V. latastei</i>	0.93		-		0.95	
Hybrids	0.99		0.95		-	
Feeding frequency (%)	19.68*	181	26.67	172	30.11*	85
Annual variation (%)		181		172		85
Spring		13		25		12
Invertebrates	0		12		0	
Reptiles	0		16		25	
Soricomorpha	30.77		32		8.33	
Rodentia	69.23		40		66.67	
Summer		16		14		12
Invertebrates	0		0		8.33	
Reptiles	12.5		14.29		8.33	
Soricomorpha	12.5		21.43		25	
Rodentia	75		64.29		58.33	
Autumn		8		6		7
Invertebrates	0		0		0	
Reptiles	12.5		0		0	
Soricomorpha	0		33.33		42.86	
Rodentia	87.5		66.67		57.14	
Feeding period	MAR-NOV		MAR-OCT		APR-OCT	

		<i>V. aspis</i>	n	<i>V. latastei</i>	n	Hybrids	n
Micro-habitat preferences							
Spring	total presences	218		180		196	
			4		3		3
	BUSHES (β)	0.06**		0.17*		-	
	ROCKS (β)	0.07***		0.27*		0.11*	
	SLOPE (β)	-		-2.87		-	
	TREES (β)	-		0.14		0.20*	
	Constant	-2.28		-9.87		-5.41	
	AUC	0.89		0.99		0.99	
	S.E.	0.04		0.01		0.01	
	CCR						
	% pres. training	82.86		95		94.74	
	% abs. training	88.57		95		89.47	
	% pres. test	100		71.43		100	
	% abs. test	66.67		100		84.62	
	total presences	47		27		51	
Summer			3		3		2
	BUSHES (β)	0.12*		0.1		0.07*	
	MOSS (β)	-		0.17		-	
	ROCKS (β)	0.08*		-		-	
	SOIL (β)	-		-		0.24*	
	TREES (β)	0.13*		-		0.05*	
	Constant	-7.46		-4.93		-4.45	
	AUC	0.94		0.98		0.94	
	S.E.	0.03		0.02		0.04	
	CCR						
	% pres. training	86.36		91.7		89.47	
	% abs. training	81.82		91.7		84.21	
	% pres. test	57.14		59		100	
	% abs. test	71.43		100		66.67	
	total presences	29		16		25	
Autumn			3		3		2
	BUSHES (β)	0.22*		0.12*		0.18	
	ROCKS (β)	-		-		0.13	
	SLOPE (β)	3.46*		4.81**		-	
	TREES (β)	0.08**		-		-	
	Constant	-15.65		-14.32		-7.9	
	AUC	0.97		0.97		0.99	
	S.E.	0.02		0.02		0.01	
	CCR						
	% pres. training	92		100		92.9	
	% abs. training	88		90.9		92.9	
	% pres. test	62.5		91.67		100	
	% abs. test	87.5		75		100	
	total presences	33		45		19	

	<i>V. aspis</i>	n	<i>V. latastei</i>	n	Hybrids	n
Activity						
Days with activity for males (%)		4		3		3
JAN-FEB	0		16.67 (0.0-33.3)		36.6 (0.0-0.6)	
MAR-APR	65.80 (57.1-72.7)		83.36 (81.0-85.7)		80.74 (77.3-84.2)	
MAY-JUN	74.65 (35.0-100)		86.36 (72.7-85.7)		68.7 (56.5-89.5)	
JUL-AUG	69.52 (28.6-100)		0		43.5 (40.0-47.0)	
SEP-OCT	48.15 (30.0-65.2)		49.6 (4.3-68.4)		41.7 (40.0-43.5)	
NOV-DEC	0		12.5 (0.0-5.0)		3.3 (0-10.0)	
Moulting periods		83		75		40
Females	APR-JUN AUG-SEP		APR-JUN AUG-SEP		APR-JUN AUG-SEP	
		105		105		53
Males	MAR-MAY AUG-OCT		MAR-MAY AUG-OCT		MAR-MAY AUG-OCT	
Annually covered distance (m)		4		3		3
Avg.	1033.4		1295.2		1331.33	
Min.	253.6		830.8		593.6	
Max.	1910.8		2283		2070	
Reproductive traits						
Detected mating period	APRIL		APRIL		MARCH	
Sexual maturatio (mm)						
Females						
smallest with embryos or deve- loped follicles	341		300		414	
smallest mating or with repro- ductive behaviour	390		470		470	
Males						
smallest mating or guarding females	395		400		440	
Date of parturition	late August - September		late August - September		late August	
Fecundity						
Avg. N° follicles	7.39 (133 foll)	9	8.80 (88 foll)	5	8.80 (88 foll)	5
SD	2.56		1.52		1.44	
Avg. N° embryos	5.75 (46 emb)	8	7.7 (77 emb)	10	5.6 (28 emb)	5
SD	2.55		2.45		1.67	
Avg. reproductive effort	0.59	7	0.74	8	0.79	3
SD	0.24		0.13		0.28	

	<i>V. aspis</i>	n	<i>V. latastei</i>	n	Hybrids	n
Reproductive traits (cont.)						
New-borns traits	4 litters	28	7 litters	53	2 litters	12
Avg. SVL (mm)	165.86***		152.42***		157.58***	
SD	11.09		7.85		19.36	
Avg. Body mass (g)	5.28		4.8		4.75	
SD	0.88		0.87		1.28	
Avg. NSB	0.75*		0.94*		0.83*	
SD	0.44		0.23		0.39	
Avg. NMAP	0.61*		0.81*		0.50*	
SD	0.5		0.39		0.52	
Avg. NWFS	0.14**		0.00**		0.00**	
SD	0.36		0		0	
Frequency of reproduction (%)						
2004*	63.2	19	65	20	80	5
2005*	11.1	18	20	14	14.3	14
2006*	18.2	11	35.3	17	26.7	15
Avg.	30.8	48	40.1	51	40.3	34
SD	28.23		22.88		34.92	

Table 1. Diet, micro-habitat, activity and reproductive traits of *V. aspis*, *V. latastei* and hybrids in the High Ebro (* significant differences for $p = [0.05 - 0.005]$; ** significant differences for $p = [0.005 - 0.001]$; *** significant differences for $p < 0.001$). (AUC, area under the curve; SE, standard error; CCR, correct classification rate; pres., presences; abs., absences; Avg., average; Min., minimum; Max., maximum; SD: standard deviation; foll., follicles; emb., embryos; SVL: snout-vent length; NSB: number of still-borns; NMAP: number of moulted new-borns after parturition; NWFS: number of new-borns with fragments of skin after moult).

References

- AEMET (2008): Datos de precipitación y temperatura de las estaciones de Sedano y Humada (Burgos, España) para el período 2003-2007. Agencia Estatal de Meteorología. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España.
- Agrimi, U., Luiselli, L. (1992): Feeding strategies of the viper *Vipera ursinii* (Reptilia: Viperidae) in Apennines. *Herpetol. J.* **2**: 37-42.
- AH-USA (2009): Abnormal shedding. Snakes diseases/General. Animal hospitals – USA. http://www.animalhospitals-usa.com/reptiles/snake_diseases_general.html
- Arnold, M.L. (1997): Natural Hybridization and Evolution. New York, Oxford University Press.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. (1985): Analysis of hybrid zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **16**: 113-48.
- Bea, A.; Braña, F.; Baron, J.P., Saint-Girons, H. (1992): Régimes et cycles alimentaires des vipères européennes (Reptilia, Viperidae). *Annee Biol.* **31**: 25–44.
- Bea, A. (1985): La repartición de las víboras *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) y *Vipera seoanei* (Lataste, 1879) en el País Vasco. Cuadernos de sección, Cienc. Nat., Eusko Ikaskunz **2**: 7–20.
- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. (1999): Ecology: individuals, populations and communities. Oxford, Blackwell Science Ltd.
- Blanchard, F.N., Finster, E.B. (1933): A method of marking living snakes for future recognition, with a discussion of some problems and results. *Ecology* **14**: 334-347.
- Bonnet, X., Naulleau, G. (1994): A body condition index (BCI) in snakes to study reproduction. *C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie.* **317**: 34-41.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R. (1999): The dangers of leaving home: dispersal and mortality in snakes. *Biol. Conserv.* **89**: 39-50.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R., Lourdais, O. (1999): What is the appropriate time scale for measuring costs of reproduction in a capital breeder such as the aspic viper? *Evolutionary Ecology* **13**:485-497.
- Brito, J.C., Crespo, E.G. (2002): Distributional analysis of two vipers (*Vipera latastei* and *V. seoanei*) in a potential area of sympatry in the Northwestern Iberian Peninsula. In: *Biology of the Vipers*, p. 129–138. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W., Eds., Utah, Eagle Mountain Publishing.
- Brito, J.C. (2003): Seasonal Variation in Movements, Home Range, and Habitat Use by Male *Vipera latastei* in Northern Portugal. *J. Herpetol.* **37**: 155–160.
- Brito, J.C., Rebelo, R. (2003): Differential growth and mortality affect sexual size dimorphism in *Vipera latastei*. *Copeia* **2003**: 865–871.
- Brito, J.C. (2004): Feeding ecology of *Vipera latastei* in Northern Portugal: ontogenetic shifts, prey size and seasonal variations. *Herpetol. J.* **14**: 13–19.
- Brito, J.C., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Sillero, N. (2008). Inferring evolutionary scenarios with geostatistics and Geographical Information Systems (GIS) for the viperid snakes *Vipera latastei* and *V. monticola*. *Biol. J. Linn. Soc.* **95**: 790–806.
- Brown, J.H., Lomolino, M.V. (1998): Biogeography. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.

- Burke, J.M., Arnold, M.L. (2001): Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 31–52.
- Cameron, T.C., Wearing, H.J., Rohani, P., Sait, S.M. (2007): Two-species asymmetric competition: effects of age structure on intra- and interspecific interactions. *J. Animal Ecol.* **76**: 83-93.
- Canova, L., Gentili, A. (2008): Diet of the asp viper *Vipera aspis* in woodland habitats of the Po plain (NW Italy). *Acta Herpetol.* **3**: 175-178.
- Clarke, R.D. (1992): Effects of microhabitat and metabolic rate on food intake, growth and fecundity of two competing coral reef fishes. *Coral Reefs* **11**: 199-205.
- Clutton-Brock, T.H., Ed. (1990): *Reproductive Success: Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems*. Chicago, University Of Chicago Press.
- Duguy, R., Martínez-Rica, J. P., Saint-Girons, H. (1979): La répartition des vipères dans les Pyrénées et les régions voisines du nord de l'Espagne. *Bul. Soc. Hist. Nat. Toulouse* **115**: 359–377.
- Gannon, W. L., Rácz, G. R. (2006): Character displacement and ecomorphological analysis of two long-eared *Myotis* (*M. auriculus* and *M. evotis*). *J. Mammal.* **87**: 171-179
- García, J.T., Arroyo, B.E. (2005): Food-niche differentiation in sympatric Hen *Circus cyaneus* and Montagu's Harriers *Circus pygargus*. *Ibis* **147**: 144-154.
- Garrigues, T., Dauga, C., Ferquel, E., Choumet, V., Failloux, A.-B. (2005): Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Mol. Phylogenet. Evol.* **35**: 35-47.
- Gause, G.F. (1935): *The struggle for existence*. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Gröning, J., Hochkirch, A. (2008): Reproductive inference between animal species. *Q. Rev. Biol.* **83**: 257-282.
- Heller, H.C. (1971): Altitudinal zonation of chipmunks (*Eutamias*): interspecific aggression. *Ecology* **52**: 312-319.
- Hewitt, G.M. (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* **58**: 247-276.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. (2005): Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Clim.* **25**: 1965-1978.
- Holm, E., Edney, E.B. (1973): Daily activity of Namib Desert arthropods in relation to climate. *Ecology* **54**: 45-56.
- Howard, D.J., Britch, S.C., Braswell, W.E., Marshall, J.L. (2003): Evolution in hybrid zones. In: *The Evolution of Population Biology*, p.297-314. Singh, R.K., Uyenoyama, M.K., Eds., Cambridge, Cambridge University Press.
- Langkilde, T., Shine, R. (2004): Competing for crevices: interspecific conflict influences retreat-site selection in montane lizards. *Oecologia* **140**: 684–691.
- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., Joger, U. (2001): Evolutionary relationships among the True Vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **19**: 94-104.

- Liu, C., Berry, P.M., Dawson, T.P., Pearson, R.G. (2005): Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography*, **28**: 385–393.
- Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Naulleau, G., Guillon, M. (2004): Climate affects offspring phenotypes in a viviparous snake. *Oikos* **104**:551-560.
- Loveridge, A.J., Macdonald, D.W. (2003): Niche separation in sympatric jackals (*Canis mesomelas* and *C. adustus*). *J. Zool.* **259**:143-153.
- Luiselli, L., Agrimi, U. (1991): Composition and variation of the diet of *Vipera aspis francisciredi* in relation to age and reproductive age. *Amphibia-Reptilia* **12**: 137-144.
- Luiselli, L., Filippi, E., Di Lena, E. (2007): Ecological relationships between sympatric *Vipera aspis* and *V. ursinii* in High-Altitude habitats of Central Italy. *J. Herpetol.* **41**: 378-384.
- Luiselli, L. (2006): Resource partitioning and interspecific competition in snakes: the search for general geographical and guild patterns. *Oikos* **114**: 193-211.
- Martínez-Freiría, F., Brito, J.C., Lizana, M. (2006a): Intermediate forms and syntopy among vipers (*V. aspis* and *V. latastei*) in Northern Iberian Peninsula. *Herpetol. Bull.* **97**: 14-18.
- Martínez-Freiría, F., Brito, J.C., Lizana, M. (2006b): Ophiophagy and cannibalism in *Vipera latastei* Boscá, 1878 (Reptilia, Viperidae). *Herpetol. Bull.* **96**: 26-28.
- Martínez-Freiría, F., Sillero, N., Lizana, M., Brito, J.C. (2008): GIS-based niche models identify environmental correlates sustaining a contact zone between European vipers. *Divers. Distrib.* **14**: 452-461.
- Martínez-Freiría, F., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Lizana, M., Brito, J.C. (2009): Geographical patterns of morphological variation and environmental correlates in contact zones: a multi-scale approach using two Mediterranean vipers. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* doi:10.1111/j.14390469.2008.00506.x
- Mayr, E. (1963): Animal species and evolution. Cambridge, Belknap Press.
- Monney, J.-C. (1996): Biologie comparée de *Vipera aspis* L. et de *Vipera berus* L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes Bernoises. PhD Thesis. Institute of Zoology, Faculty of Sciences, University of Neuchatel, Neuchatel, Switzerland.
- Moser, A., Graber, C., Freyvogel, T.A. (1984): Observations sur l’Ethologie et l’Evolution d’une Population de *Vipera aspis* (L.) au Nord du Jura Suisse. *Amphibia-Reptilia* **5**: 373-393.
- Naulleau, G., Duguy, R., Saint-Girons, H. (1998): Le système espace-temps au cours du cycle annuel chez les viperinae. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **123**:53–60.
- Obermayer, G. (1967): *Vipera aspis zinnikeri* x *Vipera ammodytes ammodytes*. *Datz* **20**: 255-256.
- Palomo, L.J., Gisbert, J. (2002): Atlas de los Mamíferos terrestres de España. Madrid, Dirección General de Conservación de la Naturaleza - SECEM – SECEMU.
- Pleguezuelos, J. M., Santos, X. (2002): *Vipera latasti*. In: Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España, p. 298-300. Pleguezuelos, J.M., Márquez, R., Lizana, M., Eds., Madrid, Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Asociación Herpetológica Española.
- Pleguezuelos, J.M. Márquez, R., Lizana, M., Eds. (2002): Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España. Madrid, Dirección General de Conservación de la Naturaleza – Asociación Herpetológica Española.

- Pleguezuelos, J.M., Santos, X., Brito, J.C., Parellada, X., Llorente, G.A., Fahd, S. (2007): Reproductive ecology of *Vipera latastei*, in the Iberian Peninsula: Implications for the conservation of a Mediterranean viper. *Zoology* **110**: 9-19.
- Ricklefs, R.E. (1998): *The Economy of Nature*. New York, W.H. Freeman and Company.
- Saint-Girons, H., Naulleau, G. (1981): Poids des nouveau-nés et stratégies reproductives des vipères européennes. *Terre et Vie* **35**: 597-616.
- Saint-Girons, H. (1957). Le cycle sexuel chez *Vipera aspis* (L.) dans l'ouest de la France. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91**: 284-350.
- Saint-Girons, H. (1975a): Observations preliminaries sur la thermoregulation des vipères d'Europe. *Vie et Milieu* **25**: 137-168.
- Saint-Girons, H. (1975b): Coexistence de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un problème de compétition interspécifique. *Terre et Vie* **29**: 590-613.
- Saint Girons, H. (1978): Thermorégulation comparée et systématique des vipères d'Europe. Étude biotéléométrique semi-naturelles. *La Terre et la Vie* **32**: 417-440.
- Saint-Girons, H. (1980a): Biogéographie et évolution des vipères européennes. *C. R. Soc. Biogeograph.* **496**: 146-172.
- Saint-Girons, H. (1980b). Modifications sélectives du régime des vipères (Reptilia, Viperidae) lors de la croissance. *Amphibia-Reptilia* **1**: 127-136.
- Saint-Girons, H. (1990a): Morphologie comparée des hybrides de *Vipera seoanei* Lataste, 1879 x *Vipera aspis* (L.). *Amphibia-Reptilia* **11**: 197-200.
- Saint-Girons, H. (1990b): Croissance, maturité sexuelle et variations ontogéniques des périodes d'alimentation et des mues chez deux vipères hybrides (*Vipera aspis* x *Vipera seoanei*) dans des conditions semi-naturelles. *Bull. Soc. Herpetol. Fr.* **54**: 62-68.
- Saint-Girons, H. (1992): Stratégies reproductives de Viperidae dans les zones tempérées fraîches et froides. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **117**: 267-278.
- Salvador, A. (1997): *Fauna Ibérica*. Vol. 10. Reptiles. Madrid, Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC.
- Santos, X., Llorente, G.A., Pleguezuelos, J.M., Brito, J.C., Fahd, S., Parellada, X. (2007): Variation in the diet of the Lataste's viper *Vipera latastei* in the Iberian Peninsula: seasonal, sexual and size-related effects. *Anim. Biol.* **57**: 49-61.
- Schoener, T. W. (1974): Resource partitioning in ecological communities. *Science* **185**: 27-39.
- Schuett, G.W., Hardy Sr., D.L., Greene, H.W., Earley, R. L., Grober, M. S., Van Kirk, E. A., Murdoch, W. J. (2005): Sympatric rattlesnakes with contrasting mating systems show differences in seasonal patterns of plasma sex steroids. *Anim. Behav.* **70**: 257-266.
- Seaman, D. E., Powell R. A. (1996). An evaluation of the accuracy of kernel density estimators for home range analysis. *Ecology* **77**: 2075-2085.
- Servedio, M.R., Noor, M.A.F. (2003): The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **34**: 339-364.

- Szymura, J. M., Barton, N. H., (1991): The genetic structure of the hybrid zone between the Wre-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*: comparison between transect and between loci. *Evolution* **45**: 237–261.
- Teerink, B.J. (1991): Hair of the West European mammals: atlas and identification. 1 Western Europe. Cambridge, Oxford University Press.
- Vitt, L.J. (1987): Communities. In: Snakes: Ecology and Evolutionary Biology, p. 335–365. Seigel, R.A., Collins, J.T., Novak, S.S., Eds., New York, Macmillan Publishing Co.
- Weatherhead, P.J., F.W. Anderka. (1984): An improved radio transmitter and implantation technique for snakes. *J. Herpetol.* **18**: 264-269.
- Wiens, J.J., Graham, C.H. (2005): Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **36**: 519–539.
- Zuffi, M.A.L., Gentilli, A., Cecchinelli, E., Pupin, F., Bonnet, X., Filippi, E., Luiselli, L.M., Barbanera, F., Dini, F., Fasola, M. (2009): Geographic variation of body size and reproductive patterns in Continental versus Mediterranean asp vipers, *Vipera aspis*. *Biol. J. Linn. Soc.* **96**: 383–391.
- Zuffi, M.A.L., Gentilli, A., Razzetti, E., Scali, S. (2001): Transition-hybridisation areas in parapatric *Vipera aspis* subspecies from northern Italy. *Biota* **2**: 52.

Termorregulación

Thermoregulation

**Termorregulación de las víboras mediterráneas
en una zona híbrida en el norte
de la península Ibérica**

**Thermoregulation of Mediterranean vipers
in a hybrid zone in Northern
Iberian Peninsula**

Manuscript in preparation for publication

Termorregulación de las víboras mediterráneas en una zona híbrida en el norte de la península Ibérica

Resumen en castellano de

Thermoregulation of Mediterranean vipers in a hybrid zone in Northern Iberian Peninsula

(Manuscript in preparation for publication)

Introducción

La selección de hábitats diferentes juega un papel crucial en especies filogenéticamente cercanas. En los reptiles, como son ectotermos, la selección de hábitats diferentes está relacionada con las preferencias termorregulativas.

En las zonas de contacto entre las distribuciones de las víboras europeas la selección de hábitats diferentes impide la coexistencia estricta. El Alto Ebro es la única zona de contacto conocida entre las tres especies de víboras Ibéricas. Los factores ambientales juegan un papel importante en la selección de hábitats e impiden la coexistencia entre la especie Eurosiberiana y las Mediterráneas, constituyendo una barrera para el intercambio genético. Sin embargo, las dos especies Mediterráneas, *V. aspis* y *V. latastei*, coexisten en una zona de simpatría, donde existen ejemplares con características morfológicas intermedias entre las dos especies. Muchos de estos ejemplares han sido identificados como híbridos, por lo que la selección de hábitats (a escala 1x1 km²) no constituye una barrera para el flujo genético entre estas dos especies.

La comparación de los rasgos ecológicos de especies parentales e híbridos en la zona de simpatría del Alto Ebro sugiere la ocurrencia de competencia interespecífica y segregación espacial y temporal del nicho ecológico. Este uso diferencial de los recursos confiere ventajas reproductivas y demográficas a *V. latastei* y los híbridos, respectivamente. Además, la zona híbrida se identifica con un modelo de zona de tensión. Sin embargo, se desconoce el papel de la calidad térmica de los hábitats y la selección y requerimientos térmicos de las víboras en la zona de simpatría del Alto Ebro.

La zona de simpatría del Alto Ebro es un buen modelo para testar los efectos de las barreras ambientales en las zonas de contacto y su asociación con diferencias fisiológicas. Diferentes comportamientos térmicos en laboratorio podrían sugerir que diferencias en los hábitats responden a diferentes preferencias térmicas.

Los trabajos de campo en termorregulación de ectotermos han mejorado desde que se usan mediciones como: 1) la distribución de las temperaturas ambientales operativas (T_e), 2) la temperatura corporal de los animales (T_b) y 3) la temperatura intrínseca preferida de los animales (T_{sel}). Estos parámetros se combinan para calcular índices como: 1) d_e , calidad térmica del hábitat, 2) d_b , precisión de termorregulación y 3) E y E' , efectividad de termorregulación. Juntos, estos índices consiguen describir como un organismo regula su temperatura en un ambiente complejo.

En este estudio se combinan datos de laboratorio y campo para identificar la calidad térmica del hábitat y la efectividad termorregulativa de dos especies de víboras simpátricas y sus híbridos. Los objetivos básicos de este estudio se reflejan en las siguientes preguntas: 1) ¿Cuál es la escala de heterogeneidad ambiental en esta área de simpatria? 2) ¿Están las temperaturas diarias cerca o dentro de los rangos térmicos óptimos de estas especies? 3) ¿Es la termorregulación consistentemente detectable para cada especie e híbridos? 4) ¿Cómo es la eficiencia en la termorregulación de las tres formas?

Materiales y métodos

Área de estudio y clasificación de las víboras

Se obtuvieron víboras adultas de la región del Alto Ebro durante 2005 y 2007. Esta área consiste en una zona de transición entre las regiones bioclimáticas Eurosiberiana y Mediterránea, con valores decrecientes y crecientes de precipitación y temperatura de Norte a Sur, respectivamente.

Las víboras fueron capturadas a mano y clasificadas como *V. aspis*, *V. latastei* o híbridos en base a un criterio morfológico (ver capítulo 2), corroborado con análisis genéticos.

Medidas de T_{sel}

Para los experimentos de T_{sel} , se utilizaron 18 *V. aspis* (9 hembras y 9 machos), 18 *V. latastei* (9 hembras y 9 machos) y 14 híbridos (5 hembras y 9 machos) (Table 1). Estas víboras fueron aclimatadas y se les suministró agua *ad libitum*.

Para medir la T_{sel} , los animales fueron puestos individualmente en un gradiente térmico circular (1 m de diámetro) con temperaturas que variaron desde 18.0 ± 1.5 to $60.0 \pm 1.5^\circ \text{C}$.

Para medir la T_b , se usaron 32 termo-sensores (gauge copper), que fueron insertados unos 3 cm en las cloacas de los animales. Las víboras con los termo-sensores fueron puestas en el medio del gradiente durante 1 hora para que se habituaran y las mediciones se realizaron en las dos horas siguientes. Además, se tomaron series discretas de temperatura cada 10 minutos usando un termo-sensor con almacenamiento de datos HOBO (Onset Computer Corporation, Pocasset, Massachusetts, USA).

Para testar las variancias de T_b a lo largo del tiempo se utilizaron test ANOVA. Para evitar los cambios cíclicos en las T_{sel} debido al fotoperiodo se dividieron las T_{sel} de acuerdo con éste.

Medidas de T_b

En los veranos de 2005 y 2007 se midieron las T_b de 3 *V. aspis* (2 hembras y 1 macho), 3 *V. latastei* (2 hembras y 1 macho) y 4 híbridos (2 hembras y 2 machos), usando técnicas de radio-telemetría (Table 2). Se utilizaron pequeños radio-transmisores de unos 0.8 g de pesos (BD-2TH, Holohil System Ltd., Carp, Ontario, Canada), cuya señal fue detectada y procesada con un receptor Telonics TR-5 (Telonics, Inc., Mesa, Arizona, U.S.A.). Para la implantación de los radio-transmisores las víboras se anestesiaron con isofluorano en el laboratorio. Después de un período de recuperación las víboras fueron devueltas al mismo lugar donde se encontraron y sus T_b fueron monitorizadas durante tres días (desde las 0700 a las 2200 o desde las 0000 a las 2400).

Medidas de T_e

Durante el verano de 2006, se midieron en el campo las T_e de varias zonas donde se encontraron las tres formas de víboras. Para ello, se usaron 9 termo-sensores Tidbit (Onset Computer Corporation, Pocasset, Massachusetts, USA), dispuestos a 33 cm en la vertical y horizontal para producir una malla cubriendo 1 m².

En los veranos de 2005 y 2007, se midieron las T_e en las proximidades de los lugares donde se determinaron las T_b . Para ello, se utilizaron 16 termo-sensores Tidbit (Onset Computer Corporation, Pocasset, Massachusetts, USA), dispuestos en línea.

En ambos casos los termo-sensores grabaron la temperatura a intervalos de 5 minutos.

Índices de termorregulación y análisis estadísticos

Se utilizaron los índices citados anteriormente para describir las actividades termorregulativas de las víboras: 1) d_b , que mide la precisión de termorregulación, un alto valor de d_b indica que las temperaturas óptimas son mantenidas con poca frecuencia; 2) d_e , que es una medida de la calidad térmica del hábitat, un alto valor de d_e indica que es un hábitat con pocas temperaturas óptimas, mientras que un valor próximo a 0 indica que la termorregulación es innecesaria para mantener la T_b ; 3) E , indica la efectividad de la termorregulación, variando de 0 -no termorregulación- a 1 -termorregulación muy efectiva-. También se utilizó el índice E' , similar al E , pero que no es indefinido cuando d_e es 0 y no es sensitivo a pequeños cambios en d_b o d_e .

Las comparaciones se realizaron con test ANOVA y las diferencias Post-hoc con test Tukey-Kramer, en el software estadístico R para Macintosh (R Development Core Team 2009)

Resultados

De manera general, los machos pasaron más tiempo que las hembras fuera de las T_{sel} ; las características termorregulativas de los machos de las tres formas fueron similares. Las hembras termorregularon más precisamente y fueron más termófilas que los machos pero con una efectividad termorreguladora más variable. Los hábitats con las T_e más similares fueron los de *V. latastei* y los híbridos, *V. aspis* está en los más fríos. *V. latastei* usa los hábitats con peor calidad térmica.

Medidas de T_{sel}

Hubo diferencias significativas en las medidas de T_{sel} . La media de las hembras de *V. aspis* fue significativamente superior a la de los machos híbridos (Table 1). La media de las hembras híbridas fue significativamente superior a la de los machos de *V. latastei* e híbridos (Table 1).

Medidas de T_b

Debido a la escasez de datos no se han podido realizar test estadísticos y los resultados se presentan de manera descriptiva (Table 2). Los machos pasan más tiempo con su T_b fuera de T_{sel} , mientras que las hembras no lo hacen. Por lo tanto, las hembras son más precisas termorregulando que los machos (Fig. 1).

Medidas de T_e

Las T_e fueron calculados al mismo tiempo y separadamente con las T_b para testar las diferencias potenciales de los hábitats de las tres formas. Se testaron las diferencias entre 3 tipos de hábitats térmicos: entre *V. aspis* y *V. latastei*, entre *V. aspis* e híbridos y entre *V. latastei* e híbridos. Los hábitats de los híbridos y *V. latastei* son similares y más cálidos que los de *V. aspis* (Fig. 2).

Índices de termorregulación

Las calidades térmicas de los hábitats fueron similares entre sexos y formas, aunque los de las hembras de *V. latastei* fueron los peores y los de las hembras híbridas los mejores (Fig. 3). Sin embargo, no hubo diferencias significativas.

Respecto a la precisión en la termorregulación, las hembras fueron significativamente más precisas que los machos (Fig. 4).

A pesar de hábitats térmicamente desfavorables las víboras son capaces de termorregular bien (Fig. 5 y 6). Las mejores son las hembras de *V. latastei*, pese a tener las peores calidades térmicas (Fig. 5). Las diferencias de E fueron significativas entre los sexos pero no entre formas, lo que sugiere que las hembras tuvieron un mayor grado de efectividad termorreguladora que los machos. Las diferencias de E' no fueron significativas ni entre los sexos ni entre formas.

Discusión

Considerando las preguntas iniciales, las conclusiones generales son que (1) en el área de simpatria del Alto Ebro existe una heterogeneidad ambiental en los hábitats térmicos. (2) Las temperaturas diarias son a veces no favorables para la termorregulación de las víboras. (3) Las tres formas y sexos termorregulan, especialmente las hembras. (4) Las tres formas y sexos son termorreguladores efectivos similares pero las hembras de *V. latastei* son particularmente efectivas.

Estas conclusiones están de acuerdo con el escenario hipotético propuesto para la zona de hibridación del Alto Ebro: una zona de tensión, donde las especies parentales son menos competitivas y los híbridos, a pesar de tener una eficacia reproductiva baja, son competitivamente superiores.

Los hábitats utilizados por las especies parentales no corresponden con sus preferencias térmicas, mientras que la de los híbridos sí. Por lo tanto, la zona de simpatria del Alto Ebro parece ser demasiado cálida para *V. aspis* y demasiado fría para *V. latastei*. Sin embargo, los híbridos al ser más termófilos seleccionan los mejores hábitats y tienen ventaja sobre los parentales.

Debido a la historia evolutiva común de las dos especies mediterráneas sería esperable que tuvieran nichos ecológicos muy similares. Esto se ha comprobado en los requerimientos de hábitat y en otros rasgos ecológicos como la dieta y la selección de micro-hábitats. Sin embargo, la competencia interespecífica lleva a las tres formas a la segregación de nicho, algo que también parece ocurrir con los ambientes térmicos.

En la zona de simpatria del Alto Ebro, las diferencias en la selección del micro-hábitat parecen tener repercusiones en los rasgos reproductivos y demográficos de *V. aspis* y *V. latastei*, respectivamente. Este estudio ha encontrado que las hembras de *V. aspis* seleccionan ambientes demasiado fríos, lo que debe repercutir en la eficacia reproductora, mientras que las de *V. latastei* seleccionan ambientes cálidos pero muy malos (grandes oscilaciones térmicas a lo largo del día), lo que debe repercutir en la alta tasa de mortalidad en las carreteras. En el Alto Ebro no deben existir ambientes térmicos buenos para estas dos especies y los mejores están ocupados por los híbridos. Los híbridos deben excluir, ya sea activamente o pasivamente, a los parentales de estos ambientes. Por lo tanto, la zona de transición ambiental del Alto Ebro debe actuar como una barrera para la extensión e intercambio genético de las dos especies de víboras mediterráneas. Serían necesarios más estudios térmicos con hembras reproductoras para elucidar los efectos de la variabilidad térmica en el Alto Ebro sobre los rasgos reproductivos de estas especies. Además, sería interesante extender estos estudios a la tercera especie de víbora presente en el Alto Ebro: *V. seoanei*.

A pesar de que este estudio constituye un avance en el conocimiento de las necesidades térmicas de estas dos especies, todavía se desconoce hasta qué punto las temperaturas seleccionadas por las tres formas son el resultado de una adaptación fenotípica o genotípica.

Thermoregulation of Mediterranean vipers in a hybrid zone in Northern Iberian Peninsula

Manuscript in preparation for publication

Abstract

Different species of European vipers tend to select structurally different habitats and with distinct microclimatic conditions. In northern Spain, the high course of the Ebro River (hereinafter High Ebro) is the only known contact zone between the three Iberian vipers, *Vipera aspis*, *V. latastei*, and *V. seoanei*. We specifically addressed the following questions: 1) What is the scale of thermal heterogeneity in this area of sympatry? 2) Are daytime temperatures near or within the optimal ranges of these species? 3) Is thermoregulation consistently detectable for each species and their hybrids? 4) How effectively do these species and hybrids thermoregulate throughout the day? In the field, vipers were captured by hand and classified as *V. aspis*, *V. latastei*, or hybrids between both species. After acclimatization to 25° C and LD 7:7, we measured T_b , and T_e in the field and T_{sel} in the laboratory. Overall, males of all three types of viper spent more time out of T_{sel} than females; males were similarly thermophilic and had similar thermoregulatory effectiveness. Females thermoregulated more accurately and were more thermophilic than males, but had a more variable thermoregulatory effectiveness. The environments with the most similar T_e were of *V. latastei* and the hybrids. *V. aspis* occurs in cooler environments. *Vipera latastei* used the thermal environments with least quality. *Vipera aspis* is a species of cooler regions that chooses warm sub-areas of the micro-habitat to speed up gestation, which is a phenomenon common to reptiles that live in cooler regions. *Vipera latastei* is a species that lives in warmer regions, often too warm, and that chooses cooler sub-areas of the micro-habitat to gestate in the appropriate range. This area of the High Ebro that is perhaps too warm for *V. aspis* and too cool for *V. latastei*. Therefore, the more thermophilic hybrids might have an advantage in the intermediate thermal habitats of the sympatry area.

Keywords: thermoregulation, *Vipera*, hybrid zone, habitat selection, interspecific competition, thermoregulatory indices.

Introduction

Differences in morphology, physiology, and behaviour among closely related species have long intrigued biologists for understanding the manner and extent of such differences control the biological diversity (Schoener, 1974). Closely related species may select different habitats. Habitat selection is extremely important for the survival of species, is partially innate and may be reinforced during ontogeny (Klopfer, 1962, 1963; Wecker, 1964; Klopfer and Hailman, 1967). For ectotherms, different habitat selections often imply different thermoregulatory preferences. Reptiles, as many other ectotherms, regulate their body temperature (T_b) within a relatively narrow range by using physiological and behavioural regulation such as shuttling among different thermal microclimates (Cowles and Bogert, 1944; Huey, 1982; Hutchison, 1979).

In contact zones, altitude, rainfall, and perhaps other environmental factors are correlated with the distribution range of European vipers (Brito and Crespo, 2002; Guisan and Hofer, 2003; Martínez-Freiría et al., 2008). Therefore, different species of European vipers tend to select structurally different habitats and with distinct microclimatic conditions (Reinert, 1984a,b; Brito and Crespo, 2002; Martínez-Freiría et al., 2008). Furthermore, these viper patterns of habitat selection along with their typically low vagility may promote a general lack of sympatry in the contact zones.

In northern Spain, the high course of the Ebro River (hereinafter High Ebro) is the only known contact zone between the three Iberian vipers, *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758), *V. latastei* (Boscá, 1878), and *V. seoanei* (Lataste, 1879). Environmental factors have an important role influencing the range of each species in the High Ebro; the selection of different habitats avoids strict coexistence and constitutes a barrier to gene flow among Eurosiberian and Mediterranean vipers (Martínez-Freiría et al., 2008). However, the closely related *V. aspis* and *V. latastei* occur in sympatry in an observed and potential (calculated with niche-based modelling techniques) area of 8 and 76 km², respectively, along the middle course of the rivers Rudrón and Sedanillo (Martínez-Freiría et al., 2006, 2008). Furthermore, vipers with intermediate morphological features (e.g. scale counts and colour pattern) were found in this area along with syntopic populations of *V. aspis* and *V. latastei*, suggesting that hybridization might occur between these two species (Martínez-Freiría et al., 2006). This hybridization was further confirmed through analyses of microsatellite variation in 217 specimens from the High Ebro. Microsatellite variation revealed the existence of gene flow between both species and that the morphologically intermediate vipers corresponded mostly to hybrids between *V. aspis* and *V. latastei* (authors, unpublished data). Therefore, at a macro scale (1x1 km UTM cells), habitat selection is not acting as a barrier to gene flow among Mediterranean vipers in the High Ebro.

Comparative analyses of ecological traits of the two species and hybrids in the sympatry area of High Ebro suggest the occurrence of high interspecific competition and spatial and temporal segregation, which might be the mechanisms that allow coexistence among the three forms (Martínez-Freiría et al., unpublished data). Niche segregation implies that different types of vipers use different resources. However in this area even with niche segregation, *V. latastei* has a reproductive advantage over the other types and hybrids have a demographic advantages (Martínez-Freiría et al., unpublished data). Moreover, endogenous selection seems to be affecting hybrids, but they show a good performance in the hybrid zone (Martínez-Freiría et al., unpublished data). Therefore, a model of tension zone (*sensu* Barton and Hewitt, 1985) is suggested for the High Ebro. However, the role of thermal quality of the habitats and the thermal selection and requirements of vipers (which could be acting as limiting factors for the different viper types) in the sympatry area of High Ebro is still unknown.

The multi-species reality for the High Ebro vipers is especially suitable to test the effects of environmental barriers in contact zones and the associated physiological differences. Vipers from these fringe areas are good subjects to test whether different species still show different thermal behaviours, even when both may potentially occupy the same areas. After acclimation, each species' differences in preferred body temperatures (T_{sel}) measured in a laboratory gradient would show an active choice of thermal environment, and thus suggest that the differences in habitat selection in these two species may result primarily from different thermal preferences. Consequently, differences in field T_b 's between these species could result mainly from different thermal selections in addition to other selections of habitat features. We followed Folk (1974), and Hutchinson and Dupré (1992) for the definition of acclimation and acclimatisation (response to a single environmental factor, and to two or more factors, respectively).

Field studies of ectotherm thermoregulation have been improved by the recognition that thermoregulatory efficiency cannot be evaluated using a single measure (Christian and Weavers, 1996; Hertz et al., 1993). To evaluate thermoregulation in field active ectotherms, several indices have been developed that use three independent data types: 1) the distribution of operative environmental temperatures (T_e), 2) field body temperatures (T_b) of the animal, and 3) the intrinsic temperature preference (T_{sel}) of the animal. These indices have been developed to answer questions about the accuracy, precision, and effectiveness of thermoregulation in small ectotherms (Hertz et al., 1993; Blouin-Demers and Weatherhead, 2001). The indices are: d_e —the thermal quality of the habitat, d_b —accuracy of thermoregulation, and E —the effectiveness of thermoregulation.

$$d_e = |T_{sel} - T_e|$$

$$E = 1 - (d_b/d_e)$$

$$d_b = |T_{sel} - T_b|$$

$$E' = d_e - d_b$$

The index E is an estimate of the effectiveness of thermoregulation or the amount that T_b is moved in the direction of T_{sel} from the null distribution (T_e). The index E' is an alternative measure of effectiveness, and is simply the difference between d_e and d_b (Blouin-Demers and Weatherhead, 2001). E' may simplify interpretation of effectiveness measures and we report both effectiveness indices throughout. Together these indices express the extent to which an organism regulates its temperature in a complex environment. However, a convincing case for thermoregulation can be made only when the indices are presented with observations of thermoregulatory behaviours or physiological measures of thermoregulation (Heath, 1964; Hertz et al., 1993).

We combined laboratory and field data to measure habitat thermal quality with indices of accuracy, precision, and effectiveness of thermoregulation for two sympatric species of vipers and their hybrids. We specifically addressed the following questions: 1) What is the scale of thermal heterogeneity in this area of sympatry? 2) Are daytime temperatures near or within the optimal ranges of these species and their hybrids? 3) Is thermoregulation consistently detectable for each species and their hybrids? 4) How effectively do these species and hybrids thermoregulate throughout the day? Because thermoregulation has a direct effect on the time of activity and the space that an organism can exploit, multi-species studies of ectotherm thermoregulation may lead to the determination of mechanisms involved in interspecific resource partitioning which is often evaluated based on time, space, and food (Pianka, 1973; Ricklefs, 1998).

Materials and methods

Study area and viper's classification

We obtained adult vipers in 2005 through 2007, from the High Ebro region, in northern Spain (latitude: N42° 37.7' to N42° 58.7'; longitude: W3° 37.3' to W3° 58.5'). The area coincides with the transition between Euro-Siberian and Mediterranean regions, and consists of flat calcareous plateaus with deep valleys and steep canyons excavated by the Ebro River and its tributaries Rudrón and Sedanillo Rivers. Altitude ranges from 621 to 1150 masl. Climate is sub-humid Mediterranean with Central European tendency. There is a gradual transition from North to South of environmental factors such as average annual temperature (ranging from 22.2 to 24.8° C) and precipitation (ranging from 829 to 697 mm per year) (Hijmans et al., 2005). The most representative bioclimatic stage is the Supra-Mediterranean but there are also elements of the Mountain stage of the Euro-Siberian region (Martínez-Freiría et al., 2006).

In the field, vipers were captured by hand and classified as *V. aspis*, *V. latastei*, or hybrids between both species. This classification used a combination of morphological characters corroborated by analyses of microsatellite variation (authors, unpublished data). The morphological

characters included snout elevation, number of apical scales, shape of the dorsal stripe, and number of dorsal markings (Martínez-Freiria et al., 2006).

T_{sel} measurements

For the T_{sel} experiments, we used 18 *V. aspis* (9 females and 9 males), 18 *V. latastei* (9 females and 9 males), and 14 hybrids (5 females and 9 males). These vipers were acclimatised on an LD 12:12 photoperiod at $25.0 \pm 1.0^\circ \text{C}$ for a minimum of 4 days before the experiments. To avoid the postprandial increase of viper T_b (Gatten, 1974), we did not feed the vipers for 7 days before each experiment, but provided water *ad libitum* during that period. Experiments were conducted in the summers of 2005 through 2007.

To measure the T_{sel} of vipers, we placed animals singly in one circular thigmothermal gradients (1-m diameter) with wood sides and a steel plate floor (3-mm thick) (DeWitt, 1967) maintained at temperatures ranging from approximately 18.0 ± 1.5 to $60.0 \pm 1.5^\circ \text{C}$. In the thermal gradients cover and moisture were kept constant: cover was provided by flat Styrofoam packaging chips and moisture was kept at about 70% relative humidity. The Styrofoam chips provided thermally neutral cover, allowing for a more thorough use of the gradient by these generally secretive animals.

To measure T_b , we used 32-gauge copper-constantan thermocouples. To prepare the thermally sensitive ends, we entwined the leads at an end of the thermocouple, fused the entwined leads together at the tip, and encapsulated the end with epoxy resin. Approximately one hour before recording body temperatures, a previously calibrated thermocouple was inserted about 3 cm deep into the viper's cloaca. We used adhesive tape to secure the exiting thermocouple wire to the viper's tail. We put each viper in the middle of the thermal gradient for habituation to the test conditions; each habituation period lasted about one hour. The thermocouple probes did not prevent the vipers from moving to any location in the thermal gradient. Each recorded part of the experiment started at the beginning of the second hour and lasted two hours. We recorded discrete time series of body temperatures at 10-minute intervals with a HOBO Thermocouple Logger (Onset Computer Corporation, Pocasset, Massachusetts, USA). In addition, we recorded the body mass of each viper before and immediately after each trial to monitor dehydration.

Measures of T_b over time often result in an inequality of T_b variances. However, in most cases ANOVA is a sufficiently robust test to overcome the assumption of equal variances implicit in the method (Winer, 1971). A common confounding effect in the determination of the T_{sel} of organisms is the cyclical changes in that preference over time (Hutchison and Dupré, 1992). Therefore, the partitioning of T_{sel} according to photoperiod resulted in more meaningful comparisons between the temperatures of species with similar cycles of activity. Overall, the major disadvantage of the

methods used to divide the vipers according to their activity, is the consequent reduction in sample size per treatments.

T_b measurements

In the summers of 2005 and 2007, the T_b 's of 3 *V. aspis* (2 females and 1 males), 3 *V. latastei* (2 females and 1 males), and 4 hybrids (2 females and 2 males) were measured in the field with radio-telemetry (Table 2). The radio signals from small (≈ 0.8 g) BD-2TH radiothermometers (Holohil System Ltd., Carp, Ontario, Canada) were detected with and processed by a Telonics TR-5 radio receiver (Telonics, Inc., Mesa, Arizona, U.S.A.). After capture by hand, the vipers were brought to the laboratory, anesthetized with isoflurane, and a small temperature-sensitive transmitter was surgically implanted. After a recovery period of about a week, the snakes were released at the exact site of capture and their T_b 's recorded for three days continuously from either 0700 to 2200 or 0000 to 2400. The recorded T_b 's were further averaged to calculate hourly mean T_b 's.

T_e measurements

In the summer of 2006, T_e were measured in the field at locations where one of the three viper types occurred most predominantly (*V. aspis*, *V. latastei*, or hybrid forms). In the summers of 2005 and 2007, T_e were measured in the vicinities of the snakes whose T_b were being measured. These measures of T_e were concomitant with the corresponding measurements of T_b . T_e measured non-concomitantly with vipers were measured with a 3 by 3 grid of 9 Tidbit temperature data loggers (Onset Computer Corporation, Pocasset, Massachusetts, USA) spaced 33 cm of vertical and horizontal distances among neighbours to produce a grid covering an area of approximately 1 m², whereas T_e measured concomitantly with vipers' T_b were measured with an array of 16 Tidbit temperature data loggers (Onset Computer Corporation, Pocasset, Massachusetts, USA). Data loggers recorded environment temperatures at 5 min intervals throughout the study period. The grid and the array were haphazardly repositioned every three hours.

Thermoregulatory Indices

We used the indices developed by Hertz et al. (1993) and elaborated by others (Bauwens et al., 1996; Christian and Weavers, 1996; Diaz, 1997) to describe viper thermoregulatory activities. The index d_b represents the accuracy of thermoregulation and is calculated as the average deviation of T_b from the T_{sel} . High d_b indicates that optimal temperatures are seldom maintained. The index d_e is the average deviation of T_e from T_{sel} . This is a complementary index to d_b and is a measure of the thermal quality of the habitat. A high d_e indicates a habitat with few optimal temperatures

whereas a d_e of zero indicates a habitat where thermoregulation is unnecessary for the maintenance of optimal T_b . The index E is an estimate of the effectiveness of thermoregulation and generally varies from 0, indicating no thermoregulation, to 1 indicating highly effective thermoregulation. This is a measure of the amount that the snake takes advantage of the thermal opportunities found in the environment to move its T_b closer to T_{sel} . We also report the index proposed by Blouin-Demers and Weatherhead (2001), the deviation of d_b from d_e . This index is similar to E but is not undefined when d_e is 0 and is not sensitive to small changes in d_b or d_e . We compared T_{sel} , T_b , and d_e data using analysis of variance (ANOVA). Post-hoc differences were ascertained with Tukey-Kramer honest significant differences tests. When multiple comparisons were performed on the same data set, we employed a sequential Bonferroni correction procedure (Rice, 1989) to maintain the probability of type II error at 0.05. We used the R statistical package for Macintosh computers (R Development Core Team 2009) to analyse our data. We reported means plus and minus their 95% confidence intervals, and set the experimental α at 0.05. The vipers used in this experiment were housed and tested in accordance with the principles and guidelines of the Universidade de Lisboa Animal Care and Use Committee.

Table 1. Summary mean active thermal preference (T_{sel}) and range for the viper types *Vipera aspis*, *V. latastei*, and hybrids, tested over a 2-hr. period and after acclimatization to 25° C and an LD 12:12 photoperiod. Type: *aspis* *Vipera aspis*, *latastei* *Vipera latastei*, hybrid hybrid between the two species; Sex: F female and M male; T_{sel} mean active thermal preference plus and minus the 95% confidence interval of the mean; range minimum and maximum values; and n sample size.

type	sex	T_{sel} (° C)	range	n
aspis	F	28.47±0.63	19.98–36.49	9
	M	25.75±0.37	20.57–29.69	9
latastei	F	25.71±0.33	19.89–34.67	9
	M	23.77±0.26	19.12–31.19	9
hybrid	F	31.27±1.26	22.10–36.08	5
	M	22.69±0.47	19.38–33.51	9

Results

Overall, males of all three types of viper spent more time out of T_{sel} than females; males were similarly thermophilic and had similar thermoregulatory effectiveness. Females thermoregulated more accurately and were more thermophilic than males, but had a more variable thermoregulatory effectiveness. The environments with the most similar T_e were of *Vipera latastei* and the hybrids. *Vipera aspis* occurs in cooler environments. *Vipera latastei* used the thermal environments with least quality.

T_{sel} measurements

There were statistically significant differences among the measured T_{sel} ($F_{5,44} = 4.35$, $p > 0.01$). The mean T_{sel} of females of *V. aspis* was significantly higher than the hybrid males (Table 1). The mean T_{sel} of hybrid females was significantly higher than that of *V. latastei* and hybrid males (Table 1).

T_b measurements

In spite of the incredible advancements in radio-transmitter miniaturization, radio-transmitters are still too large for many snakes. Therefore, our sample size for field T_b is somewhat small. Consequently, these data were not compared among themselves and are simply presented descriptively (Table 2) and used for the calculation of the thermoregulatory indices. The most conspicuous feature of the T_b measurements was that males spend some time with their T_b outside of T_{sel} , whereas females do not. Females manage to maintain their T_b within their ranges of T_{sel} during both day and night. This general observation suggests that females are more accurate (and precise) thermo-regulators (Fig. 1).

T_e measurements

T_e were calculated both concomitantly with T_b and separately to test for potential habitat differences for the three snake types. The concomitant measurements were used to calculate d_e and will be described in the next section. Three types of potential thermal habitat differences were tested: between *V. aspis* and *V. latastei*, between *V. aspis* and hybrids, and between *V. latastei* and hybrids.

Table 2. Summary mean active body temperatures (T_b) and range for the viper types *Vipera aspis*, *V. latastei*, and hybrids, tested over a three-day period and after surgical implantation with radio-thermometers. Type: *aspis* *Vipera aspis*, *latastei* *Vipera latastei*, hybrid hybrid between the two species; Sex: F female and M male; T_b mean active body temperature plus and minus the 95% confidence interval of the mean; range minimum and maximum values; and n sample size.

type	sex	T_{sel} (° C)	range	n
aspis	F	25.89±10.19	15.27–38.16	2
	M	28.29±14.24	17.34–38.84	1
latastei	F	26.07±9.06	16.84–37.91	2
	M	28.84±12.82	16.96–37.54	1
hybrid	F	27.52±9.31	15.29–38.41	2
	M	29.10±10.47	13.26–38.86	2

Figure 1. Hourly means of body temperatures (T_b) of *Vipera aspis* (yellow dots), *V. latastei* (red dots), and hybrids between these two species (orange dots). The wicks show the 95% confidence interval of the means. The horizontal black bars are the scotophase periods of the photoperiod. The grey rectangles show the range for the temperature selection (T_{sel}), measured as the temperatures between the 25th and the 75th percentiles in the distribution of viper body temperatures measured in a thermal gradient.

Habitats where the hybrids occurred are warmer than those where *V. aspis* occurred (Fig. 2). The only times when those habitats have comparable temperatures are midmorning and at the end of the day (Fig. 2). The same trend was seen for the habitats of *V. aspis* and *V. latastei*: the habitats where *V. latastei* occurred were warmer than those for *V. aspis* (Fig. 2). Finally, the habitats of *V. latastei* had similar temperatures to those of the hybrids (Fig. 2).

Thermoregulatory indices

The thermal qualities of the habitats of the different species were generally similar among types and sexes, but *V. latastei* females had the habitats with worst (higher) d_e (Fig. 3), whereas hybrid females had the best (lower) d_e (Fig. 3). However, type and sex had no statistically significant effect on differences among d_e . Typically, the habitats had a progressively improving d_e from the beginning of the day until noon, then a worsening period that lasted until 1500 followed by a period of improvement until 1800 (Fig. 3). After 1800, d_e would worsen again (Fig. 3).

Figure 2. Hourly means of operative temperatures (T_e) calculated for the habitat pairs where which studied viper type occurs. Yellow dots show *Vipera aspis* T_e , orange dots hybrid T_e , and red dots *V. latastei* T_e . The wicks show the 95% confidence interval of the means. The horizontal black bars are the scotophase periods of the photoperiod. These values of T_e were measured non-concomitantly with vipers, and were thus a null-hypothesis T_e .

Figure 3. Hourly means of the thermal quality of the environment (d_e) for the habitats used by the different types of vipers studied. Yellow dots show *Vipera aspis* d_e , orange dots hybrid d_e , and red dots *V. latastei* d_e . The wicks show the 95% confidence interval of the means. The horizontal black bars are the scotophase periods of the photoperiod. Low values of d_e show high thermal quality of the environment (perfect quality is 0).

Regarding the accuracy of thermoregulation, females and males behaved differently (Fig. 4). With the exception of the mornings, females had a very high degree of diurnal thermoregulatory accuracy (low d_b) (Fig. 4). Type had no statistical effect on differences among d_b , but sex had a highly significant effect ($F_{2,1,2,72}=3.52$; $p < 0.01$). There was also a significant effect for the interaction between type and sex ($F_{2,1,2,72}=21.01$; $p = 0.04$), suggesting that the sexes in the different types thermoregulated differently. For females, thermoregulatory accuracy decreased typically at night (Fig. 4). Males had a much lower degree of diurnal thermoregulatory accuracy (high d_b) and had two brief periods of high accuracy: morning and evening (Fig. 4).

High values of E (and E') show that in spite of a thermally unfavourable habitat, ectotherms are able to thermoregulate well. The viper types we studied had similar effectiveness of thermoregulation (Figs. 5 and 6). The group with highest effectiveness were the females of *V. latastei* (both for E and E'); the same group that had had the habitat with worst thermal qualities (Fig. 5). Type had no statistical effect on differences among E , but sex had a significant effect ($F_{2,1,2,72}=6.23$; $p = 0.02$), thus suggesting that females had a higher degree of thermoregulatory effectiveness than males. Regarding comparisons of E' , both type and sex had no statistical effects.

Figure 4. Hourly means of the thermoregulatory accuracy (d_b) of the different types of vipers studied. Yellow dots show *Vipera aspis* d_b , orange dots hybrid d_b , and red dots *V. latastei* d_b . The wicks show the 95% confidence interval of the means. The horizontal black bars are the scotophase periods of the photoperiod. Low values of d_b show high thermoregulatory accuracy (perfect accuracy is 0).

Discussion

Considering our initial questions, we concluded that in the small area of sympatry in the High Ebro 1) there is a small, fine scale of thermal heterogeneity in this habitat. Moreover, daytime temperatures 2) are sometimes unfavourable for the thermoregulation of these vipers. All the considered viper types and sexes 3) thermoregulated with particular emphasis for the thermoregulation of females of all types. Finally, all viper types and sexes were 4) similarly effective thermoregulators, but the females of *Vipera latastei* were particularly effective.

These conclusions are according to the hypothetical scenario suggested for vipers in the hybrid zone of the High Ebro, which may be a tension zone (Martínez-Freiría et al., unpublished data). In this tension zone, the parental species could not spread into the allopatric ranges of the other species, because they would be less competitive than the other species. However, the hybrids, despite of having low reproductive fitness, have a better performance than parental species in the transitional environments but not out of it (Arnold, 1997). By and large, the viper species and hybrids in the sympatry area of High Ebro seem to behave according to the hypothetical scenario.

Figure 5. Hourly alternative thermoregulatory effectiveness (E') *sensu* Blouin-Demers and Weatherhead (2001) of the different types of vipers studied. Yellow dots show *Vipera aspis* E', orange dots hybrid E', and red dots *V. latastei* E'. The horizontal black bars are the scotophase periods of the photoperiod. High values of E' show high effectiveness.

Vipera aspis females are more thermophilic than the females of *V. latastei*, and the hybrid females are more thermophilic than the others. Therefore, one would expect the micro-habitats selected by *V. aspis* to be warmer than those selected by *V. latastei*, and the hybrids to choose the warmest micro-habitats. Nevertheless, *V. latastei* and hybrids micro-habitats are consistently warmer than those of *V. aspis*. This suggested that the thermal preferences of *V. aspis* conflict with the prevailingly available temperatures in their micro-habitat. However, *V. aspis* d_b was higher, suggesting that in their cooler micro-habitats, they choose sub-areas with the best temperatures. *Vipera latastei* were the least thermophilic and selected warmer micro-habitats, albeit with the worst thermal quality. They had the highest thermoregulatory effectiveness, thus suggesting that the females of *V. latastei* have to find the cooler sub-areas in their warmer micro-habitat. The hybrids chose warmer micro-habitats similar to those of *V. latastei*, but they were more thermophilic than this parental species. This is the type of viper whose females may more easily find appropriate sub-areas in their habitat for thermoregulation. The differences in thermal preferences between the parental species may be explained by differing micro-habitat choices. On the one hand, *V. aspis* is a species of cooler regions that chooses warm sub-areas of the micro-habitat to speed up gestation, which is a phenomenon common to reptiles that live in cooler regions. On the other hand, *V. latastei* is a species that lives in warmer regions, often too warm, and that chooses cooler sub-areas of the micro-habitat to gestate in the appropriate range and evade the Critical Thermal Maximum (CTMax) of the species. This area of the High Ebro that is perhaps too warm for *V. aspis* and too cool for *V. latastei*. Therefore, the more thermophilic hybrids might have an advantage.

Vipera aspis and *V. latastei* are closely related viper species that diverged from a common ancestor during the Pliocene and evolved under different local environments in refugia in Southern Europe during the Pleistocene Ice Ages (Lenk et al., 2001; Garrigues et al., 2005). In spite of this divergence, one should expect their ecological niches to be very similar, as that is what is expected for sister species (Wiens and Graham, 2005). For these two species, this similarity has been seen when certain habitat requirements and some ecological traits such as diet or major components in micro-habitat selection are taken in account (Martínez-Freiría et al., 2008, unpublished data). However, natural selection in species in sympatry may drive to niche segregation, and thus species tend to partition the use of resources to minimize competitive interactions (Ricklefs, 1998). Most extant reptiles are ectotherms and for them temperature may be as important a resource as food (Magnuson et al., 1979).

In the sympatry zone of the High Ebro, differential micro-habitat selection of vipers has been suggested as having repercussions on the reproductive traits of *V. aspis* females and on the

demographic traits of *V. latastei* females (Martínez-Freiría et al., unpublished data). Optimal thermoregulatory conditions during gestation affect *V. aspis* pregnant female's output (Lourdais et al., 2004), thus the higher mortality rates and diseases in new-borns found in the High Ebro could be due to the use of suboptimal thermoregulatory sub-areas by females during pregnancy (Martínez-Freiría et al., unpublished data). Nevertheless, females of *V. latastei* get a successful reproduction in terms of effective fecundity (Martínez-Freiría et al., unpublished data). Indeed, they were found to be particularly effective in thermoregulation. However micro-habitats selected by them show high temperatures through the daily cycle, which is related to a great loss of body mass during pregnancy (Bonnet et al., 1999; Lourdais et al., 2002a,b). Therefore, after parturition females of *V. latastei* have low body fat reserves, increasing their vulnerability to predators and road mortality (Martínez-Freiría et al., unpublished data). However, why do not use better micro-habitats? Probably, because there are not many optimal micro-habitats for the parental species in the transitional environments of the hybrid zone. The hybrids with their mixed set of thermal preferences wind up having the best habitats available to them. In fact, in the hybrid zone, the hybrids are more abundant than the parental species, in spite of their intermediate reproductive fitness, and have low road

Figure 6. Hourly thermoregulatory effectiveness (E) *sensu* Hertz et. al. (1993) of the different types of vipers studied. Yellow dots show *Vipera aspis* E, orange dots hybrid E, and red dots *V. latastei* E. The horizontal black bars are the scotophase periods of the photoperiod. Values of E close to one show high effectiveness.

mortality (Martínez-Freiría et al., unpublished data). Consequently, hybrids may be out-competing actively *V. aspis* and *V. latastei* to sub-optimal micro-habitats, or passively because they have the right physiological preferences for the prevailing thermal environments. Out-competition from a determinate spot through interference competition has been documented in many species of reptiles (e.g. Langkilde and Shine, 2004) and mutual exclusion was referred as occurring among European vipers in contact zones (Saint-Girons, 1975, 1980; Bea, 1985; Martínez-Freiría et al., unpublished data).

Therefore, our results suggest that the habitats in the hybrid area of the High Ebro have low thermal quality for the thermal requirements of the parental species, and that competitive exclusion mechanisms among viper types might be occurring. Low thermal quality and competitive exclusion may have repercussions on the population dynamics of both parental species, causing the transitional environments of the hybrid zone to be a barrier to species extension and thus to gene flow. Nevertheless, more detailed comparative thermal studies with pregnant females are needed to further elucidate the effects of the thermal variability in the High Ebro micro-habitats on the reproductive traits of vipers. Furthermore, it would be interesting to extend these comparisons to the third species of viper present in the area, *V. seoanei*. In addition to physiological and ecological comparisons, one should test whether *V. seoanei* hybridizes with any of the other two species, thus defining a second potential tension zone.

Heretofore, thermoregulatory traits of Mediterranean vipers were only studied in semi-captivity (e.g. Saint-Girons, 1978) or laboratory experiments (but only *V. aspis* e.g. Bonnet et al., 1999; Lourdaïs et al., 2002a,b, 2004), and nothing was known about them in natural conditions. Moreover, no thermoregulatory study had taken the advantage of studying the thermoregulation of different viper species occurring in sympatry. In spite of these advancements in our knowledge of the thermoregulation of Western Mediterranean vipers, it remains unclear whether the different temperatures selected by the different viper types are a result of phenotypic rather than genotypic adaptations (*sensu* Gould and Vrba, 1982). The vast literature on physiological acclimatisation and acclimation suggests that inter-population differences determined in the absence of proper “common garden” (a *tabula rasa* approach to acclimatisation) controls may not be genetically based (Garland and Adolph, 1991). Furthermore, inter-population differences, regardless of their genetic or environmental origins, cannot be deemed as adaptations without proper test for the adaptive value of the considered adaptations (Garland and Adolph, 1991).

Acknowledgements

This study was partially supported by project POCTI/BIA-BDE/55596/2004 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal). FMF was supported by a PhD grant (AP2003-2633) from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). JPA was in receipt of a fellowship from Fundação para a Ciência e a Tecnologia SFRH/BPD/3514/2000, Portugal, and a SYNTHESYS project (ES-TAF-1251), Spain. Authors acknowledge “Asociación Sociocultural Hoces del Alto Ebro y Rudrón” (Burgos, Spain) and also the many friends and students who helped with the field work in the High Ebro. We further thank Dr. José Martín and the Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) for the access to the biological station of El Ventorrillo. We also thank M. Clara Figueirinhas and Hélder Duarte and for the long periods of data collection.

References

- Arnold, M.L. (1997). *Natural Hybridization and Evolution*. New York, Oxford University Press.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113-48.
- Bauwens, D., Hertz, P.E., Castilla, A.M. (1996). Thermoregulation in a lacertid lizard: the relative contributions of distinct behavioral mechanisms. *Ecology* **77**: 1818–1830.
- Bea, A. (1985). La repartición de las víboras *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) y *Vipera seoanei* (Lataste, 1879) en el País Vasco. *Cuadernos de sección, Cienc. Nat., Eusko Ikaskunz* **2**: 7-20.
- Blouin-Demers, G., Weatherhead, P.J. (2001). Thermal ecology of black rat snakes (*Elaphe obsoleta*) in a thermally challenging environment. *Ecology* **82**: 3025-3043.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R., Lourda, O. (1999). What is the appropriate timescale for measuring costs of reproduction in a ‘capital breeder’ such as the aspic viper? *Evolutionary Ecology* **13**: 485–497.
- Bowker, R.G. (1984). Precision of thermoregulation of some African lizards. *Physiological Zoology* **57**: 401–412.
- Bowker, R.G., Johnson, O.W. (1980). Thermoregulatory precision in three species of whiptail lizards (Lacertilia: Teiidae). *Physiological Zoology* **53**: 176–185.
- Box, G.E.P., Jenkins, G.M., Reinsel, G.C. (1994). *Time series analysis: forecasting and control*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., USA.
- Brito, J.C., Crespo, E.G. (2002). Distributional analysis of two vipers (*Vipera latastei* and *V. seoanei*) in a potential area of sympatry in the North-western Iberian Peninsula. Pp. 129-138. In: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.). *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Utah.
- Christian, K., Weavers, B.W. (1994). Analysis of the activity and energetics of the lizard *Varanus rosenbergii*. *Copeia* **1994**: 289–295.
- Cowles, R.B., Bogert, C.M. (1944). A preliminary study on the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **83**: 261–296.
- DeWitt, C.B. (1967). Precision of thermoregulation and its relation to environmental factors in the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis*. *Physiological Zoology* **40**: 49-66.

- Diaz, J.A. (1997). Ecological correlates of the thermal quality of an ectotherm's habitat: a comparison between two temperate lizard populations. *Functional Ecology* **11**: 79–89.
- Folk, G.E., Jr. (1974). *Textbook of environmental physiology*. Lea & Febiger, Philadelphia, PA, USA.
- Garrigues, T., Dauga, C., Ferquel, E., Choumet, V., Failloux, A.-B. (2005). Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**: 35–47.
- Garland, T., Jr., Adolph, S.C. (1991). Physiological differentiation of vertebrate populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**: 193–228.
- Gatten Jr., R.E. (1974). Effects of temperature and activity on aerobic and anaerobic metabolism and heart rate in the turtles *Pseudemys scripta* and *Terrapene ornata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **48**: 619–648.
- Gould, S.J., Vrba, E.S. (1982). Exaptation—a missing term in the science of form. *Paleobiology* **8**: 4–15.
- Guisan, A., Hofer, U. (2003). Predicting reptile distributions at mesoscale: relation to climate and topography. *Journal of Biogeography* **30**: 1233–1243.
- Heath, J.E. (1964). Reptilian thermoregulation: evaluation of field studies. *Science* **146**: 784–785.
- Hertz, P.E., Huey, R.B., Stevenson, R.D. (1993). Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question. *American Naturalist* **142**: 796–818.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965–1978.
- Huey, R.B. (1982). Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. Pp. 25–92. In: *Biology of the Reptilia (Physiology C: Physiological Ecology)*. Gans, C., Pough, F.H. (Eds.). Academic Press, New York City, N.Y., USA.
- Hutchison, V.H. (1979). Thermoregulation. Pp. 207–228. In: *Vipers: perspectives and research*. Harless, M., Morlock, H. (Eds.). John Wiley and Sons, Inc., New York City, N.Y.
- Hutchison, V.H., Dupré, R.K. (1992). Thermoregulation. Pp. 206–249. In: *Environmental Physiology of the Amphibia*. Feder, M.E., Burgren, W. (Eds.). University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Hutchison, V.H., Spriesterbach, K.K. (1986). Diel and seasonal cycles of activity and behavioral thermoregulation in the salamander *Necturus maculosus*. *Copeia* **1986**: 612–618.
- Klopfer, P.H. (1962). *Behavioral aspects of ecology*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., USA.
- Klopfer, P.H. (1963). Behavioral aspects of habitat selection: the role of early experience. *Wilson Bulletin* **75**: 15–22.
- Klopfer, P.H., Hailman, J.P. (1967). *An introduction to animal behavior*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., USA.
- Langkilde, T., Shine, R. (2004). Competing for crevices: interspecific conflict influences retreat-site selection in montane lizards. *Oecologia* **140**: 684–691.

- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., Joger, U. (2001). Evolutionary relationships among the True Vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**: 94-104.
- Lourdais, O., Bonnet, X., Doughty, P. (2002a). Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Journal of Experimental Zoology* **292**: 487-493.
- Lourdais, O., Bonnet, X., Shine, R., Denardo, D., Naulleau, G., Guillon, M. (2002b). Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment: a longitudinal study of a viviparous snake. *Journal of Animal Ecology* **71**: 470-479.
- Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Naulleau, G., Guillon, M. (2004). Climate affects offspring phenotypes in a viviparous snake. *Oikos* **104**:551-560.
- Magnuson, J. J., Crowder, L. B., Medvick, P. A. (1979). Temperature as an Ecological Resource. *American Zoologist* **19**: 331-343.
- Martínez-Freiría, F., Brito, J.C., Lizana, M. (2006). Intermediate forms and syntopy among vipers (*V. aspis* and *V. latastei*) in Northern Iberian Peninsula. *Herpetological Bulletin* **97**: 14-18.
- Martínez-Freiría, F., Sillero, N., Lizana, M., Brito, J.C. (2008). GIS-based niche models identify environmental correlates sustaining a contact zone between European vipers. *Diversity and Distributions* **14**: 452-461.
- Pianka, E.R. (1973). The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* **4**: 53-74.
- Reinert, H.K. (1984a). Habitat separation between sympatric snake populations. *Ecology* **65**: 478-486.
- Reinert, H.K. (1984b). Habitat variation within sympatric snake populations. *Ecology* **65**: 1673-1682.
- Rice, W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**: 223-225.
- Ricklefs, R.E. (1998). *The Economy of Nature*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Saint-Girons, H. (1975). Coexistence de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un probleme de competition interspecifique. *Terre et Vie* **29**: 590-613.
- Saint Girons, H. (1978). Thermorégulation comparée et systématique des vipères d'Europe. Étude biotélé-métrique semi-naturelles. *La Terre et la Vie* **32**: 417-440.
- Saint-Girons, H. (1980). Biogéographie et évolution des vipères européennes. *C. R. Société Biogéographie* **496**: 146-172.
- Schoener, T.W. (1974). Resource partitioning in ecological communities. *Science* **185**: 27-39.
- Wecker, S.C. (1964). Habitat selection. *Scientific American* **211**: 109-116.
- Wiens, J.J., Graham, C.H. (2005). Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **36**: 519-539.
- Winer, B.J. 1971. *Statistical principles in experimental design*. McGraw-Hill, New York, N.Y., USA.

Variación genética y zona híbrida

Genetic variation and hybrid zone

**Una aproximación híbrida a la hibridación: la aplicación
de herramientas moleculares, geo-estadísticas y SIG
al estudio de una zona de contacto
entre tres víboras Ibéricas**

**Hybrid approach to hybridization: the application
of molecular, geostatistical and GIS tools to the
study of a contact zone between
three Iberian vipers**

Manuscript in preparation for publication

Una aproximación híbrida a la hibridación: la aplicación de herramientas moleculares, geo-estadísticas y SIG al estudio de una zona de contacto entre tres víboras Ibéricas

Resumen en castellano de

Hybrid approach to hybridization: the application of molecular, geostatistical and GIS tools to the study of a contact zone between three Iberian vipers

(Manuscript in preparation for publication)

Introducción

Las zonas híbridas han sido objeto de debate entre la comunidad científica desde hace muchos años. Actualmente, las zonas híbridas se consideran como herramientas en la comprensión de procesos evolutivos y su estudio ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido a la implementación de los estudios moleculares. Un caso frecuente de hibridación ocurre en los límites de distribución de especies alopátricas, donde el desenvolvimiento de barreras pre y post-zigóticas para el aislamiento reproductor todavía no se ha completado. Los híbridos pueden verse afectados por selección endógena, dependiente de la recombinación genética, y/o exógena, dependiente del ambiente. Según las características de las zonas híbridas se establecen los siguientes modelos: modelos de zonas híbridas temporales o estables, modelo de zonas de tensión y modelo de superioridad de los híbridos.

La variación en los rasgos genéticos o morfológicos suelen manifestarse por medio de gradientes geográficos entre las poblaciones de las zonas híbridas. Existen ejemplos de clinas tanto en plantas como en animales; éstas suelen darse sobre todo en las zonas de transición ambiental o ecotono. A pesar de la información geográfica inherente en estos gradientes, las zonas de ecotono nunca han sido tratadas desde el punto de vista de la ecología del paisaje. Técnicas como los SIG o la modelación ecológica del nicho suelen utilizarse superficialmente en el estudio de las zonas híbridas. Recientemente el uso de estas herramientas a nivel morfológico en algunas zonas híbridas ha revelado la utilidad de esta metodología en el estudio de zonas de contacto.

Las víboras europeas son un buen modelo para estudiar procesos de flujo genético interespecífico a través de la ecología del paisaje. Se trata de un grupo monofilético, que evolucionó bajo procesos de especiación alopátrica durante los periodos fríos del Cuaternario. Sus rangos de distribución son parapátricos pero se solapan en zonas de contacto coincidentes con zonas de transición

ambiental. Usualmente, la competencia interespecífica en las zonas de contacto lleva a la segregación del hábitat y no existe realmente coexistencia entre las especies en contacto. Sin embargo, existen algunas zonas de contacto donde se da la coexistencia y hay especímenes que presentan características morfológicas intermedias entre las especies en contacto, sugiriendo la existencia de procesos de hibridación.

En la Península Ibérica existen tres especies de víboras con distribución parapátrica, dos cercanas filogenéticamente de origen mediterráneo, *V. aspis* y *V. latastei*, y otra más distante de origen euro-siberiano, *V. seoanei*. Presentan varias zonas de contacto entre sus distribuciones, pero sólo se conoce una, el Alto Ebro, donde contactan las tres especies. En esta zona de contacto, se ha observado la existencia de alopatria entre los pares más alejados filogenéticamente, mientras que simpatria entre el par cercano, *aspis-latastei*, en un área de 8 km², donde además existen individuos con morfología intermedia entre estas especies. Mediante técnicas de modelación de nicho se ha identificado una zona de 76 km² de transición ambiental donde la simpatria podría ocurrir potencialmente. En esta zona ambas especies convergen morfológicamente y análisis genéticos han descubierto que muchos individuos con características intermedias son híbridos entre ambas especies. El análisis comparativo de los rasgos ecológicos de las dos especies y los híbridos sugieren un escenario de elevada competencia interespecífica y la ocurrencia de segregación espacial y temporal. Además, los híbridos tienen baja eficacia reproductiva, lo que sugiere la ocurrencia de selección endógena.

Este estudio combinará SIG, modelación del nicho ecológico, geo-estadística y análisis moleculares para responder a las siguientes preguntas: 1) ¿Cómo está estructurada espacialmente la variación genética de las poblaciones de *V. aspis*, *V. latastei* y *V. seoanei* en la zona de contacto del Alto Ebro? 2) ¿Existen grupos genéticos (parentales e híbridos) coherentes? 3) ¿Cuáles son los requerimientos ecológicos de cada grupo? 4) ¿Dónde se localiza espacialmente la zona híbrida y el nicho potencial para los genotipos recombinantes?

Material y métodos

Área de estudio, muestras y morfología

El área de estudio del Alto Ebro se localiza en el norte de España y cubre 792 km². El paisaje se caracteriza por la existencia de páramos con profundos valles escavados por el Ebro y sus afluentes. El rango altitudinal va desde los 590 a los 1250m. El área se corresponde con una zona de transición entre las regiones bioclimáticas Eurosiberiana y Mediterránea. La precipitación media anual decrece, mientras que la temperatura anual media se incrementa de norte a sur.

Entre marzo de 2004 y octubre de 2007 se desarrollaron muestreos a pie y en coche basados en

celdas UTM 1x1 km, prospectándose en total un 30.5% del área de estudio. Los especímenes se capturaron a mano, su localización fue recogida con un GPS, y se clasificaron en base a un criterio morfológico (ver capítulo 2). La localización de cada ejemplar fue asignada a su correspondiente celda UTM 1x1 km. Para los análisis de ADN, se cortaron pequeños trozos de la cola y de la parte ventral para los especímenes vivos y atropellados, respectivamente.

Procedimientos y análisis genéticos

La extracción de ADN fue realizada en 217 ejemplares de las tres especies usando QIAamp DNA Micro kit (Qiagen). La cantidad y calidad de las extracciones fueron evaluadas por electroforesis en un gel con 0.8% de agarosa.

Para el análisis del polimorfismo en la zona de contacto, se usaron 11 microsatélites desarrollados para *V. berus*; de estos se seleccionaron diez, se agruparon y amplificaron a través de múltiples reacciones de PCR con Taq PCR Master Mix kit (Quiagen). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en el secuenciador automático Applied Biosystems 3130XL. Los genotipos se visualizaron con el software GeneMapper (ABI).

El análisis de la estructura de las poblaciones se realizó con el software Structure 2.2, que aplica una aproximación bayesiana, asignando una probabilidad de pertenencia a cada población a partir de los datos moleculares. Como se sabía que eran tres especies diferentes, este valor se aplicó para estructurar las poblaciones. Se escogieron frecuencias de alelos correlacionadas y un modelo mezclado debido al conocimiento de la existencia de formas intermedias. Los valores de Q con intervalos de probabilidad ($p=0.90$) fueron computados para cada individuo.

Las probabilidades de pertenencia a cada población fueron proyectadas en el área de estudio, usando las coordenadas anotadas en el campo para cada ejemplar, para evaluar la congruencia espacial de los resultados obtenidos con el Structure. Para producir un área continua, los valores fueron interpolados usando el Peso de la Distancia Inversa (IDW) con la biblioteca *gstat* en el software R.

Las afinidades para cada población fueron exploradas con un análisis de componentes principales en el software R. Los datos fueron divididos en cuatro poblaciones: las tres especies y los híbridos. Se obtuvo una tabla con la discriminación de los individuos por grupos para los procedimientos de modelación del nicho ecológico.

Modelación del nicho ecológico

Se aplicó una metodología de presencias para la modelación ecológica con el algoritmo de máxima entropía en el software Maxent v3.2.19. Se escogieron una serie de variables

eco-geográficas no correlacionadas que son conocidas por influenciar la distribución de las víboras (Tabla 1), continuas y con una resolución de 1km.

Los cuatro grupos se introdujeron en Maxent para crear un modelo para cada uno. Se construyeron 10 réplicas de modelos para cada grupo con un porcentaje de test del 25% y la medida de jackknife para estimar la importancia de cada variable. Se utilizó 0.5 como valor beta para evitar modelos excesivamente generalizados. Se computó la media y la desviación estándar para cada grupo. Los modelos fueron testados con curvas ROC y el valor de corte fue hallado con el área bajo la curva (AUC) de los gráficos ROC. La importancia de cada variable en el modelo final se comprobó con el incremento de la ganancia durante la fase del entrenamiento. El otro método para determinar la importancia de las variables fue el análisis jackknife.

Para determinar el nicho potencial de cada grupo se generaron las curvas de respuesta de cada variable para los modelos de las tres especies e híbridos.

Análisis de la zona híbrida

Se realizó un transecto de 15.250 m a lo largo del río Rudrón donde existe gran cantidad de híbridos (Fig. 1). Para el análisis de las clinas se seleccionaron todos los individuos con una distancia de 750 m a ambos lados del río. Los individuos fueron proyectados ortogonalmente y se calculó la distancia a lo largo del transecto, siendo 0 la al extremo norte de la línea.

Con una clina medida y el ancho definido de la zona híbrida, se asegura la relación con las variables a lo largo del transecto. Los valores de cada variable fueron extraídos y representados en contra de su posición en el transecto. Éste fue dividido en tres zonas iguales: 1) el área de *V. aspis*, 2) el área de los híbridos y 3) el área de *V. latastei*. Se realizaron test de Wilcoxon para comprobar las diferencias ambientales entre cada área.

Resultados

La interpolación de las afinidades para cada población dadas por el Structure revelan un patrón diferente para cada especie (Fig. 2). Cada especie se localiza en una zona y la zona de contacto entre *V. aspis* y *V. latastei* es sinuosa y no muy bien definida.

Los resultados del análisis de componentes principales (Fig. 3) claramente dividen 2 áreas con los dos primeros componentes: 1) *V. aspis* y *V. latastei*, con una serie de individuos híbridos entre las dos; 2) *V. seoanei*. El agrupamiento de las afinidades resulta en 80 individuos en el primer grupo, 25 en el segundo, 92 en el tercero y 13 en el cuarto correspondiendo a *V. latastei*, híbridos entre *V. aspis* y *V. latastei*, *V. aspis* y *V. seoanei*, respectivamente.

Los modelos de nicho ecológico desarrollados para los cuatro grupos son precisos e identifican las áreas de potencial ocurrencia (Fig. 4) y las variables que forman el nicho de cada uno (Fig. 4). Hay variables en común entre los cuatro grupos, pero también hay variables específicas para cada grupo.

Los perfiles de las curvas de respuesta muestran un patrón contrastado entre los grupos (Fig. 5). *V. aspis* y *V. latastei* presentan comportamientos similares en la variable distancia a vegetación herbácea. *V. seoanei* y los híbridos también muestran una respuesta similar en esta variable. *V. aspis*, *V. latastei* y los híbridos ocurren en áreas con pendiente, mientras que *V. seoanei* prefiere áreas planas. La presencia de bosques perennes es importante para *V. aspis* y los híbridos pero muestran comportamientos un poco diferentes. *V. aspis* y *V. latastei* tienen una respuesta similar en la precipitación anual, mientras que los híbridos y *V. seoanei* muestran respuestas opuestas. La presencia de zonas húmedas limita la distribución de *V. aspis* y los híbridos, mientras que la presencia de bosques mixtos es importante para los híbridos. *V. aspis* y *V. latastei* están influenciadas por la presencia de bosques de hoja caduca.

La división del transecto en tres zonas iguales ha resultado en diferencias no significativas para la distancia a zonas húmedas en las tres áreas (Fig. 6). Sólo *V. latastei* y los híbridos muestran nichos similares en la pendiente y en la temperatura mínima. En casi todas las otras variables, se ha rechazado la hipótesis de que una zona estaba relacionada con las otras. Con lo que la distribución de *V. aspis*, *V. latastei* y los híbridos sigue patrón en gradiente.

La distribución potencial de *V. aspis* y *V. latastei* (Fig. 7) cubre aproximadamente la misma extensión, estando la primera presente en la zona central y norte, y la segunda en el sur. El área potencial de *V. seoanei* es más pequeña y localizada en el noroeste. El hábitat potencial para los híbridos se localiza a lo largo del río. La desviación estándar de los modelos indica la más alta varianza en los límites del hábitat potencial más elevado para *V. aspis*, *V. latastei* y los híbridos, mientras que para *V. seoanei* exhibe un patrón disperso con la excepción de una zona con valores altos en el centro-oeste. *V. aspis* y *V. latastei* solapan su área potencial en 28 celdas UTM; 16 de ellas son identificadas como hábitat potencial para los híbridos.

Discusión

Los resultados son muy similares a los estudios previos sobre selección de hábitat y variación morfológica en esta zona de contacto, pero con mayor precisión y mostrando nuevas perspectivas. Los resultados replican las relaciones filogenéticas y el conocimiento previo sobre las zonas de contacto entre víboras europeas.

Modelación molecular y ecológica

Los datos fueron satisfactoriamente divididos en cuatro grupos: las tres especies y los híbridos entre *V. aspis* y *V. latastei*. Con lo que se pudieron utilizar los datos para crear modelos de nicho ecológico.

Los modelos de *V. seoanei* fueron de peor calidad, sin embargo, muestran claramente un alto grado de separación respecto a las otras poblaciones. Esto es evidente cuando se comparan las variables que explican la distribución potencial. *V. seoanei* selecciona hábitats opuestos a las víboras mediterráneas, lo que lleva a una distribución alopátrica. Este patrón replica los estudios existentes en zonas de contacto entre especies no cercanas, en el que se concluye que la selección de hábitats diferentes, se debe a diferentes requerimientos térmicos, evita el contacto con otras especies y constituye una barrera pre-zigótica para el intercambio genético. Esto se observa con los resultados de los agrupamientos del análisis de componentes principales. La selección de hábitats diferentes como barrera pre-zigótica entre los clados Eurosiberiano y Mediterráneo se debe a diferentes historias evolutivas y de hecho, la hibridación entre miembros de este clado sólo ha sido encontrada en condiciones de cautividad.

Las poblaciones de *V. aspis* y *V. latastei* se modelaron satisfactoriamente. Aunque hay variables específicas para cada especie, hay otras en común (distancia a vegetación herbácea), lo que lleva a un área de potencial simpatría entre las dos especies. Esto concuerda con las observaciones y estudios anteriores. Además, la variable en común entre las dos especies es la variable más relacionada con la distribución de los híbridos. De hecho, los híbridos comparten una distribución potencial muy solapada con el área potencial de simpatría entre las dos especies. Por lo que queda claro que la selección de hábitat permite la coexistencia y no actúa como una barrera para el intercambio genético entre especies mediterráneas. Esto se debe al hecho de compartir una historia evolutiva muy próxima y que lleva a que ambas especies conserven nichos ecológicos muy similares.

La zona híbrida

La zona de simpatría – zona híbrida entre *V. aspis* y *V. latastei* tiene unas características medio-ambientales específicas que la constituyen como una zona de ecotono. En esta zona las dinámicas poblacionales de ambas especies parentales parecen estar en equilibrio y ninguna podría expandirse en el área de distribución de la otra especie. Además, los híbridos parecen tener ventajas demográficas sobre las especies parentales, a pesar de tener una eficacia reproductiva menor. La zona norte de la Península está constituida por una fuerte transición entre dos regiones bioclimáticas. Las necesidades ecológicas de los parentales producen picos en determinados valores de algunas variables (ej. precipitación anual), mientras que la respuesta de los híbridos suele ser transversal a

ambos picos, lo que indica una preferencia por un hábitat de transición. Otras variables indican potencial simpatria (ej. pendiente). Por lo que algunos factores ambientales llevan a la exclusión especial y otros al contacto entre las formas.

Las zonas húmedas son importantes en la distribución de los híbridos mientras que las formas parentales residen en la vecindad. Esto es coherente con la hipótesis de que el río Rudrón actúa como una zona de tensión entre las dos especies. El modelo ecológico de los híbridos claramente exhibe un ecotono y sugiere zonas de potencial expansión a lo largo de la cuenca del río. La presencia de un hábitat de transición recibe un soporte adicional con los resultados de la división del transecto en tres zonas.

La presencia de un ecotono y una baja introgresión entre *V. aspis* y *V. latastei*, con la adición de que no existen híbridos fuera del ecotono, sugiere una baja viabilidad y un efecto sumidero de los híbridos en la zona híbrida. Esto concuerda con los análisis comparativos de los rasgos ecológicos de las tres formas en la zona híbrida del Alto Ebro. Esta zona de transición ambiental constituye una barrera para el intercambio genético entre las dos especies. Sin embargo, la alta tasa mortalidad en las carreteras de las especies parentales puede estar favoreciendo las cópulas interespecíficas.

Conclusiones

La combinación de la metodología utilizada en este estudio ha resultado muy exitosa y efectiva, con lo que debería ser utilizada en el estudio de otras zonas híbridas en la península Ibérica.

El norte de la península constituye un área interesante para los estudios sobre hibridación. Los estudios sobre hibridación en víboras deberían extenderse a otras zonas de contacto existentes en el norte de Iberia, puesto que podrían informar sobre los procesos evolutivos ocurridos en un interesante refugio glacial. Además, sería importante incrementar el número de microsatélites y desarrollar algunos específicamente para estas especies, así como aumentar el número de transectos.

Hybrid approach to hybridization: the application of molecular, geostatistical and GIS tools to the study of a contact zone between three Iberian vipers

Manuscript in preparation for publication

Abstract

This study uses a hybrid approach, merging Geographical Information Systems, ecological niche models, geostatistics and molecular analysis to study a hybrid zone between European vipers (*Vipera aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei*). The study is developed in a transition area (279km²) between Atlantic and Mediterranean biogeographic provinces: the High Ebro in Northern Spain. It is aimed to answer the following questions: (1) how is genetic variation of populations spatially structured? (2) Are there any coherent genetical groups (parental and hybrids)? (3) Which are the ecological requirements of each group? (4) Where are spatially located the hybrid zone and the potential niche for recombinant genotypes?

A total of 217 specimens were sequenced for variation of 10 microsatellites and affinities to putative populations were determined with genetic structure analyses. Affinities were interpolated with inverse distance weighted algorithm, examined for variation with principal components analysis (PCA) and for group coherence with clustering algorithms. Putative groups were analysed with ecological niche models, maximum entropy, to derive response curves along environmental gradients and predictive models of occurrence for each parental and hybrid form. A 15 250 m transect along the hybrid zone was used analyse variation of genetic affinities along meaningful environmental gradients.

PCA affinities and patterns of habitat selection replicate previously known models of distribution and morphological variation in the High Ebro. High genetic affinities to *V. aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei* were detected in the northern, southern and north-western regions of the study area, respectively. Transition zones between *V. seoanei* and the other vipers were sharp but coarse between *V. aspis* and *V. latastei*. PCA discriminated four putative groups with spatial coherence, including the parental forms a group of hybrids between *V. aspis* and *V. latastei*. Environmental factors correlate with the location of the hybrid zone by shaping the species range: some enhance spatial exclusion and constrain distribution to spatially non-overlapping ranges, while others allow contact between species. Ecological models tend to follow the observed distribution and all forms

follow the environmental gradient of the study area. Areas of probable occurrence of hybrids were located along a narrow (75 km²) strip along the Rudrón river basin.

The Rudrón river acts as a tension zone between *V. aspis* and *V. latastei* and ecological models suggest this region as an ecotone. The presence of an ecotone, low introgression between these vipers, and the absence of hybrids outside the ecotone, suggests low viability of hybrids with an *hybrid sink* effect in the hybrid zone.

Key Words: Ecological Niche Modelling, Geostatistics, GIS, Hybridization, Microsatellites, *Vipera*

Introduction

Hybrid zones are an old subject of discussion in science with different perspectives regarding to its importance in the evolution of species. Traditionally, the interaction of two species generating hybrids was seen as a rare aspect of species evolution, and it was accepted that unviable/infertile offspring resulted from that interaction (Darwin, 1859). Currently, hybridization is seen as an important process that allows understanding important evolutionary questions and is considered as a possible pathway to speciation (Barton & Hewitt, 1985, 1989). Contributing to this paradigm shift is the intensive molecular information of hybrid zones that is being produced during the last de-cades, demonstrating that the recombination of different species' genotypes is a common process in nature (Arnold, 1997; Mallet, 2007) and revealing patterns otherwise difficult to distinguish only with other traits, such as morphological variation (Mallet, 2005).

One frequent case of hybridisation occurs when hybrids arise at the limits of the distribution of parental forms (e.g. Reudink, 2007; Mebert, 2008), where species densities are usually low (Brown et al., 1995). This pattern may emerge after allopatric isolation with divergent selection events, where a broken gene flow is promoted between spatially isolated species, with the evolution of reproductive isolation mechanisms (Barton & Hewitt, 1985, 1989). In some cases, the developed prezygotic and postzygotic isolation is not complete, and when species contact again, hybrids may be generated (Arnold, 1997).

The hybrids fate largely depends on the combination of genetic arrangement - endogenous selection – and the environment – exogenous selection (Arnold, 1997; Burke & Arnold, 2001). The unfitness of hybrids may generate reinforcement by the post-zygotic selection against deleterious genes and, thus, increasing the isolation of parapatric parental species. This framework contributed largely for the classical notion of ephemeral hybrid zones; however, with a certain balance of dispersal of parental forms to the area and selection against hybrids, these zones can persist over time,

and tension zones are created (Barton & Hewitt, 1985). Nonetheless, hybrids may develop a higher fitness (Moore, 1977; Seehausen, 2004), where exogenous selection plays an important role (Burke & Arnold, 2001). The hybrid offspring, when viable and fertile, have a genetic variability that may adapt to an ecological niche out of the parental forms niche range (Moore, 1977). The persistence on the hybrid area is maintained by reproduction between hybrids and backcrosses with parental forms – characteristics of a hybrid swarm (Gay et al., 2008), and by the gene flow between parental species, which is also stimulated (Mallet, 2005).

Variation in genetic or morphological traits in hybrid zones tends to exhibit a geographical gradient from one parental population to the other, which can be smooth or steep, depending on the hybrid zone arrangement (Arnold, 1997; Burke & Arnold, 2001). Important measures can be assessed along this gradient, such as rates of gene flow or selective pressure (Barton & Hewitt, 1985). There are several studies of clines across many different taxa, including invertebrates (Bridle et al., 2001; Ritchie et al., 2001; Blum, 2008), amphibians (Sequeira et al., 2005), reptiles (Gifford, 2008), birds (Gay et al., 2008) and mammals (Teeter et al., 2008), and using a wide range of markers and phenotypic traits. The dependence on geographic distance turns gradients sensible to heterogeneities in the landscapes. In fact, Barton and Hewitt (1985) argued that tension zones usually coincide with major landscape features between the distributions of both parental forms.

Despite the geographic information inherent to this trait gradient, the ecotone where hybrids reside and the possible bimodal distribution of their parental forms have never been fully studied under the light of landscape ecology. As Swenson (2008) recently noticed, there has been an increasing interest in the application of Geographical Information Systems (GIS) and Ecological Niche Models (ENM) software in molecular studies, as the demanding of spatial answers to molecular questions increases. However, the applications of GIS and ENM in molecular research remains poorly developed: GIS is usually only used for storing and displaying data and basic distance analysis (Kozak et al., 2008; Storfer et al., 2007; Swenson, 2008), but the full potential includes a bulk of algorithms to study the spatial pattern observed in living forms. These include, among others, spatial interpolations of punctual data to generate continuous surfaces over the study area, spatial principal component analysis and modelling of species distribution (see Storfer et al., 2007 for a review on landscape genetics methods). Moreover, the availability of a immense resources of landscape data at different resolutions and scales (ranging from worldwide to very detailed regional data) is a reality. Free spatial data are available, including land cover, climate, water bodies and geology, among others (see Kozak et al., 2008 for a review), and fit a wide range of spatial needs for molecular data. Recent studies on hybrid zones of several taxa (Ritchie et al., 2001; Swenson, 2008; Martínez-Freiría et al., 2008, 2009) reveal the extent of the applications of

these methods on the study of contact zones and sympatry areas.

European vipers are an outstanding group for studying interspecific gene flow processes through the use of landscape genetics. They constitute a monophyletic group which evolved during the Quaternary ice ages under a probable allopatric speciation process (Lenk et al., 2001; Garrigues et al., 2005). Their current ranges are mostly parapatric but several contact zones between distributions of the different species are known in environmental transitional areas (Saint-Girons, 1980). Usually, interspecific competition lead species to segregate the habitat in contact zones (Luiselli, 2006), thus species really do not coexist and present an allopatric distribution at local scale (e.g. Duguy et al., 1979; Bea, 1985; Brito & Crespo, 2002; Luiselli et al., 2007). However, the existence of a few contact zones where viper species meet in sympatry, i.e. coexistence at local scale (e.g. Saint-Girons, 1975; Monney, 1996; Martínez-Freiría et al., 2006, 2008) and specimens presenting intermediate morphological characteristics (similar scale counts and colour pattern) among species in contact (Zuffi et al., 2001; Martínez-Freiría et al., 2006, 2009), suggests the occurrence of hybridization processes in some contact zones among European viper species.

In the Iberian Peninsula there are three parapatric viper species, two sibling Mediterranean, *V. aspis* and *V. latastei*, and one phylogenetically distant Euro-Siberian, *V. seoanei* (Lenk et al., 2001; Garrigues et al., 2005), which have several contact zones along their distribution areas (see Martínez-Freiría et al., 2009 for details). One of them, the high course of Ebro river (hereafter High Ebro), in northern Spain, is the only known local where the three Iberian vipers meet in contact (Duguy et al., 1979; Pleguezuelos et al., 2002). An allopatric distribution pattern at local scale (1x1 km cells) was found for the phylogenetically distantly-related pairs, *aspis-seoanei* and *latastei-seoanei*, whereas sympatry was observed for the closely-related *aspis-latastei* in an area of 8 km² along the middle course of the rivers Rudrón and Sedanillo, where specimens with intermediate morphological characteristics have been also found (Martínez-Freiría et al., 2006). Ecological niche modelling techniques identified a transitional environmental area of 76 km² where *V. aspis* and *V. latastei* could potentially be found together (Martínez-Freiría et al., 2008). The contact area among both species was recognized as a morphological integration zone where a convergent north-south pattern in morphological variability was correlated with environmental variables and intermediate vipers are found (Martínez-Freiría et al., 2009). Comparative analyses of ecological traits of the two species and hybrids suggest a scenario of high interspecific competition for the sympatry area of the High Ebro and the occurrence of spatial and temporal segregation for allowing coexistence among the three forms (Martínez-Freiría et al., unpublished data). Moreover, reproductive fitness of hybrid population is intermediate among parental species which suggests the occurrence of endogenous selection (Martínez-Freiría et al., unpublished data).

This study will use a hybrid approach, merging GIS, ENM, geostatistics and molecular analysis to answer the following questions: (1) how is genetic variation of *Vipera aspis*, *V. latastei* and *V. seoanei* populations spatially structured in the High Ebro? (2) Are there any coherent genetical groups (parental and hybrids)? (3) Which are the ecological requirements of each group? (4) Where is spatially located the hybrid zone and the potential niche for recombinant genotypes?

Given the presence of a strong climatic gradient in the High Ebro (Martinez-Freiría et al., 2008), it can be predicted a narrow hybrid zone in the intermediate area between the ecological needs of *V. aspis* and *V. latastei*. On the other hand, given the distinct habitat selection patterns and lack of morphological convergence between *V. seoanei* and the other two vipers (Martinez-Freiría et al., 2008, 2009), it can be predicted that *V. seoanei* exhibits allopatric distribution and there is lack of gene flow with *V. aspis* and *V. latastei*.

Material and Methods

Study area, sampling survey and morphology

The study area of the High Ebro, in northern Spain (Fig. 1), ranges from 42.928°N to 42.629°N and from 3.968°W to 3.672°W, covering a total of 792 UTM 1 x 1 km squares. Landscape is characterized by flat plateaus with deep valleys excavated by the Ebro River and its tributaries, Rudrón and Sedanillo rivers, and adjacent smooth mountains. Altitude ranges from 590 to 1250 m. The area matches with the transition between Euro-Siberian and Mediterranean regions. Climate is sub-humid Mediterranean with Central European tendency. Average annual precipitation gradually decreases from north with 880 to south with 702 mm/year whereas average annual temperature increases from north with 21.7 to south with 24.8°C (Hijmans et al., 2005).

Between March 2004 and October 2007, visual encounter surveys and random road sampling based on 1 x 1 km UTM grid were performed throughout the study area. Sampled squares were spatially distributed across the study area in order to cover the range of environmental variability (Fig. 1). In total, 242 squares were sampled, representing 30.5% of the study area.

Specimens were captured by hand and their geographical location (UTM coordinates; European 1950 datum) was recorded with a GPS and downloaded into ArcMap 9.2 GIS. Specimens were classified as *V. aspis*, *V. latastei*, *V. seoanei*, or intermediate forms between *V. aspis* and *V. latastei* according to the following combination of morphological characters: snout elevation, number of apical scales, shape of the dorsal stripe, and number of dorsal marks. Specimens were classified as intermediate when exhibiting contradictory or intermediate morphological traits (for details see Martínez-Freiría et al., 2006). Viper records were recorded in a georeferenced database and assigned to the corresponding 1x1 km UTM square. Small bits of tissue from the tail and ventral

Figure 1. Location of the study area in the Iberian Peninsula and in the confluence of Ebro, Rudrón and Sedanillo rivers. Dots represent the locations of the sampled individuals. Red dots indicate individuals found inside a 750m buffer of the hybrid zone transect (in grey).

parts of each live and road-kill specimen, respectively, were collected and preserved in tubes with alcohol 96° for DNA analyses.

Genetic procedures and analysis

DNA extraction was carried on 217 samples from the three species with the QIAamp DNA Micro kit (Qiagen). Quality and quantity of DNA extractions were evaluated in a 0.8% agarose gel electrophoresis. Bands were observed under UV light, after coloration with ethidium bromide.

For the analysis of the polymorphism in the contact zone, 11 microsatellites developed for *Vipera berus* were selected (Carlsson et al., 2003; Ursenbacher, personal communication). Amplification conditions were tuned and genotype reading was enhanced given that none of these loci had been previously used for the species under study. Ten microsatellites were chosen, grouped according to the annealing temperature and amplified by multiplex PCR reactions with Taq PCR Master Mix kit (Quiagen). The amplified products were separated by capillary zone electrophoresis in an Applied Biosystems 3130XL automatic sequencer. The screening of genotype were done in GeneMapper (ABI) software and manually confirmed.

The analysis of population structure was done with Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). This software applies a bayesian approach to assess the population structure from multilocus molecular data, by assigning a probability of membership to each population (Pritchard et al., 2000). As there are three known distinct populations, k was set to this value and was expected a strong structuring in the populations. The software was run without defining the geographical origin of each individual with 1 000 000 MCMC after a 10 000 length burn-in. The intentional absence of spatial coordinates of individuals as a prior to define the structure of populations avoided a circular reasoning later when data are spatially analysed. Correlated allele frequencies and an admixture model were chosen due to the known presence of intermediate individuals (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). Q values with probability intervals ($p = 0.90$) were computed for each individual.

The probabilities of population membership were projected in the study area using the coordinates recorded on the field. To produce a continuous surface over the study area, those values were interpolated with Inverse Distance Weighted (IDW). This surface simplifies the visual evaluation of spatial patterns and the spatial congruence of Structure results. This process was done with *gstat* library (Pebesma, 1998) in R software (R Development Core Team, 2009).

The affinities to each population were explored with principal component analysis (PCA) in R software. The data were clustered in four partitions representing the three species and a group of individuals that can not be classified in the others, i.e. probable hybrids. The partition around medoids clustering algorithm of the library cluster was used (Maechler et al., 2005). The algorithm begins to find a set of n medoids in the data and attribute each sample to a medoid, based on the Euclidean distance to its centre. A data table with clusters discrimination by individual was extracted for Ecological Niche Modelling (ENM) procedures.

Ecological niche modelling

Ecological-niche based models were developed with maximum entropy algorithm. This method finds the maximum entropy distribution constrained by the ecogeographical variables (EGV). This was provided by Maxent v3.2.19 software (Phillips et al., 2004, 2006) and it is known to perform better than other models, even when the number of presences is low (Elith et al., 2006, Hernandez et al., 2006). A set of weakly correlated EGVs ($r < 0.45$ in all cases) were chosen based on their known influence on the viperid snakes distribution (Brito & Crespo, 2002; Guisan & Hoffer 2003; Santos et al., 2006; Martinez-Freiria et al., 2008) and fall into three main groups (Table 1): (1) topographical – slope derived from a digital elevation model (USGS, 2004); (2) climatic – precipitation and temperature grids extracted from Worldclim v1.4 (Hijmans et al., 2005); and (3) habitats

– a set of six EGVs representing the distance of a land cover category. The land cover is composed of 14 months (1999-2000) satellite data acquired by the VEGETATION sensor on-board of SPOT 4 satellite (GLC, 2003). All variables are continuous and have a resolution of 1 km. When a EGV had higher resolution, it was used the function *aggregate* of ArcGIS 9.2 to average the value of higher resolution cells comprised in a one kilometre cell.

The four clusters were inputted to Maxent as four different species in order to create a model for each. Ten model replicates for each cluster data were developed with the test percentage set to 25%, random seed and jackknife measure of variable importance. The remove values option was chosen to only use one presence per variable pixel. To avoid overfitting or excessive generalization of the models, the beta multiplier value was set heuristically to 0.5 to all models as it generates conservative models, although extends the predictive power beyond cells with presence. It was computed the average and standard deviation model of each cluster. The first represents the potential distribution, whereas the latter gives an indication of the uncertainty per pixel between all predictions. All models were tested with receiver operated characteristics (ROC) plot and a value of overall fit was given by the area under the ROC curve (AUC). The importance of each EGV to the final model is computed based on the increment of gain they can generate during the training phase of the algorithm. As those values are heuristic estimates and EGVs are not strongly correlated, running 10 replicates will give a better understanding of the importance of each EGV on the final model. The other method used to test EGVs importance was the jackknife, in which a model is built with all EGVs except one and other with only the excluded predictor and the train and test gain, as well as AUCs values are recorded. This can be indicative the effect each variable have on the analysis and, therefore, which one the model depend most.

Table 1. Environmental factors used to model the distribution of *Vipera aspis*, *Vipera latastei*, *Vipera seoanei* and hybrids in the High Ebro contact zone.

Environmental factors	Abbr.	Range and units	Source
Distance to Mixed Forests	DMF	0 to 4000 m	GLC (2003)
Distance to Needle-leaved Evergreen Forests	DNEF	0 to 8544 m	GLC (2003)
Distance to Broadleaved Deciduous Forests	DBDF	0 to 6708 m	GLC (2003)
Distance to Humid Areas	DHA	0 to 5657 m	GLC (2003)
Distance to Herbaceous Vegetation	DHV	0 to 22627 m	GLC (2003)
Distance to Broadleaved Deciduous - Thicket	DBDT	0 to 17889 m	GLC (2003)
Slope	SLP	5 to 45 %	USGS (2004)
Annual Precipitation	AP	698 to 881 mm/year	Hijmans et al. (2005)
Minimum Temperature	MT	-1.3 to 2.0 °C	Hijmans et al. (2005)

The analysis of the potential niche of the three viperid snakes and hybrids can be extremely informative of the tendency of each species to a specific zone within the range of possible EGVs values. Therefore, the response curves were visually analysed to describe the behaviour of prediction with each EGV (Austin, 1987). Similar profiles for different species would indicate a shared resources usage, i.e. possible sympatry between species; whereas distinct responses were taken as indicative of divergent relationship.

Hybrid zone analysis

The analysis of the hybrid zone was done in a 15 250 meters length transect along river Rudrón where hybrids are known to occur (Fig. 1). All individuals within a buffer of 750 meters radius based on the transect line were selected for the cline analysis. The individuals were projected orthogonally to the transect line and the distance along transect calculated, with 0 meters being the northernmost edge of the line.

With a measured cline and a defined hybrid zone width, we assessed their relationship with EGVs along the hybrid transect. This was given by the position on the transect of the shortest distance to the centroid of each intersected cell. The extracted EGVs values were plotted against their position on the transect. The latter was divided in three equal areas that correspond to the areas of *V. aspis*, hybrids and *V. latastei*. The significance of the environmental differences between these areas was assessed by the Wilcoxon signed-rank test.

Results

The interpolation of the affinities to each population given by the Structure analysis reveals a distinct and spatially coherent pattern for each population (Fig. 2). High affinities to *V. aspis* and *V. seoanei* occur in the northern part, divided between the eastern and western areas, respectively, while affinities to *V. latastei* occur in the southern portion of the study area. The three populations exhibit a contact zone in a narrow sympatry area along the Rudrón-Sedanillo river basins. The transition area between *V. seoanei* and the other vipers is narrow, but the contact area between *V. aspis* and *V. latastei* is sinuous and not so well defined.

The PCA analysis of Structure population affinities scores (Fig. 3) clearly separated specimens along the first two components. The first component (61.9% of variation) divides the population of *V. aspis* and *V. latastei*, showing a continuous pattern of individuals in between the two, with shared affinities scores with the two populations. Apparently, there are no hybrid specimens between *V. seoanei* and the other two parental forms. The second PCA component (38.1% of variation) separates populations corresponding to *V. seoanei* from the group of *V. aspis*, *V. latastei*

Figure 2. Interpolation of the affinities scores displaying the population structure in the High Ebro. The numbers designate local rivers: (1) Ebro river; (2) Rudrón river; (3) Sedanillo river and (4) San Antón river.

Figure 3. PCA plot of the affinities scores with the first two components. The four clusters represent the populations of viperid snakes: (1) *V. latastei*; (2) hybrids; (3) *V. aspis* and (4) *V. seoanei*.

and the hybrids between these two. The clustering of affinities grouped 80 individuals in the first cluster, 25 in the second, 92 in the third and 13 in the fourth cluster corresponding to *V. latastei*, *V. aspis*-*V. latastei* hybrids, *V. aspis* and *V. seoanei*, respectively.

The fitness of ecological models was high as demonstrated by the average AUC value between replicates always higher than 0.919 for training and 0.771 for test data (Fig. 4). The variables explaining most of the distributions globally are the distance to herbaceous vegetation, slope and the distance to needle-leaved evergreen forests (Fig. 4). However, the most important variables vary among species: (1) for *V. aspis* distance to humid areas, distance to needle-leaved evergreen forests and distance to herbaceous vegetation; (2) for *V. latastei* annual precipitation, distance to

Figure 4. Average jackknife measure of variable importance in the ecological niche modelling procedure for each environmental factor, given in percentages (in the left) and average AUC values of the final models (in the right).

broadleaved deciduous forests and distance to herbaceous vegetation; (3) for *V. seoanei* distance to needle-leaved evergreen forests, slope and annual precipitation; (4) and for hybrids distance to herbaceous vegetation, distance to mixed forests and distance to humid areas.

The profiles of the response curves exhibited a contrasting pattern between populations (Fig. 5). The distance to herbaceous vegetation reveals a peak for potential habitat for *V. aspis* and *V. latastei* at 8 km, however the latter shows another peak in the presence of this land cover class. *V. seoanei* and the hybrids exhibit a similar pattern for this variable, with the highest potential in the presence of the herbaceous vegetation and decreasing linearly with the distance. The slope shows that *V. aspis*, *V. latastei* and hybrids occur in the steepest areas, and while *V. seoanei* prefers flat

Figure 5. Average response curves of the most important environmental factors related to the distribution of each viper form.

areas. The presence of needle-leaved evergreen forests is important to the presence of *V. aspis* and hybrids. Both responses decrease with the increasing distance, but whereas the first has a sharp effect, the latter decreases linearly. *V. latastei* has a peak at a distance of 4km and *V. seoanei* reveals better response at greater distances. *V. aspis* and *V. latastei* have an approximately normal response to annual precipitation with a peak at 780 and 720 mm, respectively. Hybrids and *V. seoanei* have an opposite linear response, preferring the first low precipitation and the latter higher precipitation. The presence of humid areas is limiting the distribution of *V. aspis* and hybrids, while the presence of mixed forests is important for the hybrids. *V. aspis* and *V. latastei* presences are influenced by the presence in the neighbourhood of broadleaved deciduous forest.

The division of the transect in three equals areas resulted in non-significant differences for the distance to humid areas for the three areas ($\chi^2 = 2.307$, $P = 0.511$) (Fig. 6). Only *V. latastei* and hybrids share similar ecological niches for slope and minimum temperature. In almost all other

Figure 6. Analysis of each environmental factor along the transect. The transect was divided in three equal areas (white and grey bands in each plot) and the environmental values orthogonally projected into the transect. The standard deviation of the average of each transect division is also displayed.

environmental variables, the hypothesis of any of the three areas being related to the others was rejected ($P < 0.10$ in all cases except: *V. latastei*-hybrids for AP and MT and *V. aspis*-hybrids for DHV), and the distribution of *V. aspis*, *V. latastei* and hybrid specimens follows a gradient pattern.

The average ecological models for *V. aspis* and *V. latastei* (Fig. 7) shows that the potential distribution covers approximately the same extent (147 and 132 km², respectively, for $p > 0.17$ and $p > 0.27$), being the former present in the central-northern and the latter in the southern parts of the study area, respectively. The potential habitat for *V. seoanei* is slightly smaller (100 km² for $p > 0.44$) although spread by the north-western part of the study area. The potential habitat for the hybrids is located in a narrow strip along the river line (75 km² for $p > 0.37$). The standard deviation of the models replicates indicate higher variance in the limits of higher potential habitat for the *V. aspis*, *V. latastei* and hybrids, while for *V. seoanei* exhibit a widespread pattern with the exception of the high potential area located in the central-western part of the study area. *V. aspis* and *V. latastei* shared areas of occurrence within 28 UTM squares and 16 of these squares were also identified as potential for the occurrence of hybrids.

Figure 7. Distribution models for the four forms of studied vipers: *V. aspis*, hybrids, *V. latastei* and *V. seoanei*. The numbers designate local rivers: (1) Ebro river; (2) Rudrón river; (3) Sedanillo river and (4) San Antón river.

Discussion

The integrative analysis of the hybrid zone among the three Iberian vipers in the High Ebro using molecular and modelling approaches revealed as an effective descriptor of the evolutionary and ecological processes in this complex area. Results are very similar to previous studies of habitat selection and morphological variation in this contact zone (Martínez-Freiría et al., 2008, 2009), but having more accuracy and showing new perspectives: a more detailed use of land cover variables and the use of a molecular, instead of morphological criteria have allowed the ecological niche modelling of real true forms and hybrids. PCA affinities and patterns of habitat selection replicate phylogenetical relationships and previous knowledge about contact zones among European vipers, respectively.

Molecular and ecological modelling

The application of a clustering algorithm over the population affinities scores was used to avoid the use of a subjective threshold and resulted in an efficient method to select the individuals in each population. This method successfully divided the dataset into clusters identified as each of the three viperid species and one of hybrids between *V. aspis* and *V. latastei*. Therefore, it was possible to use these binary data to build ecological models of the genetic populations' structure, including the hybrids potential habitat.

Ecological niche models for *V. seoanei* yielded inferior results, with the decrease of consensus area by the high standard deviation between replicates due to low sample size of presence data. Moreover, the high standard deviation is indicative that the variables used to model the other species are not enough to explain its ecological requirements. Nevertheless, the overall pattern that emerges from the results is the high degree of separation among *V. seoanei* and the others populations. This is visible in the ecological niche models and when comparing among the variables related to the distribution of *V. seoanei* with the variables related to the distribution of the other species. *V. seoanei* only shares one variable with *V. aspis*, distance to needle-leaved evergreen forests, and another with *V. latastei*, annual precipitation, but showing an opposite pattern in the response curves. Thus, the Eurosiberian *V. seoanei* selects opposite habitats to those selected by the two Mediterranean species which is reflected in an allopatric pattern without areas of sympatry. This is well reflected in the interpolations of population affinities scores: a sharp transition among the area for *V. seoanei* to the area of the other viperid species without sympatric areas. This distribution pattern replicates those observed in other contact zones among no sibling species such as among *V. aspis* and *V. berus* in the Atlantic Loire in France (Saint-Girons, 1975) and in the pre-Alps region in Switzerland (Monney, 1996), *V. aspis* and *V. ursinii* in Tolfa mountains in Italy

(Luiselli et al., 2007), *V. seoanei* with *V. aspis* in the Spanish Bask country and Atlantic Pyrenees in Spain (Bea, 1985) or with *V. latastei* in the Gerês mountains in Northern Portugal (Brito & Crespo, 2002). Different habitat selection is due to different thermal requirements and it hampers the contact among *V. seoanei* with the other viper species, acting as a pre-mating barrier to gene flow (Martínez-Freiría et al., 2008). In fact, it is signalled by the cluster of *V. seoanei* in the PCA space which was isolated from the others indicating a distinct genetic background from the others. *V. seoanei* is a Eurosiberian species of the *berus* clade which is estimated to have diverged from the Mediterranean *aspis* clade before Miocene period (Lenk et al., 2001). Thus, barriers to gene flow among members of these clades should be very strong. In fact, hybridization among members of these clades was only reported for captivity conditions (*V. aspis* x *V. seoanei*, Saint-Girons, 1990a,b), which reinforces the role of habitat selection as a strong pre-mating barrier to gene flow among Eurosiberian and Mediterranean species.

V. aspis and *V. latastei* populations were successfully modelled. Variables related to the distribution of both vipers are mostly different: *V. aspis* use habitats of herbaceous vegetation, needle-leaved evergreen open forests and humid areas, whereas *V. latastei* use those consisting of areas with low precipitation, broadleaved deciduous thicket and herbaceous vegetation. However both species share areas with herbaceous vegetation in which annual precipitation acts as a limiting factor in the distribution of *V. latastei*, giving priority to areas with low precipitation. In the High Ebro, sympatry and syntopy among both species was observed in an area of 8 km² consisting of abandoned fields with herbaceous vegetation and bushes in the confluence of Sedanillo with Rudrón river (Martínez-Freiría et al., 2006). Moreover, previous work with ecological niche modelling techniques, but using a morphological criterion for species determination, reports a potential area of sympatry of 76 km² in the surroundings of these rivers (Martínez-Freiría et al., 2008). The major influence of the hybrids' distribution was the presence of an herbaceous land cover, which was identified also as the first and third major influence for *V. aspis* and *V. latastei*, respectively. This unfolds a potential sympatric area of 28 km² among both species located in the same position as revealed by previous works and coincident with a 50% of the potential area of occurrence for hybrids. Thus, it is clear that habitat selection allows coexistence and is not acting as a barrier to gene flow among Mediterranean species. *V. aspis* and *V. latastei* are members of the *aspis* clade, thus, they shared the same evolutionary history till late Pliocene, when a probable allopatric speciation process caused the separation and evolution of populations under different environmental conditions (Hewitt, 1996; Lenk et al., 2001; Garrigues et al., 2005). Nevertheless, and as usual in sister species (Wiens & Graham, 2005), both viper species conserve similar ecological niches and this can be observed in habitat selection and even in other ecological traits such as high overlap in diet preferences and microhabitat use in the High Ebro (Martínez-Freiría et al., unpublished data).

The hybrid zone

The sympatry-hybrid area among *V. aspis* and *V. latastei* has special environmental characteristics configuring an ecotone. The transitional habitat between both parental ranges configures a peculiar habitat, where none of them exhibit an advantage over each other and where the hybrids are produced and reside when viable. Comparative analyses of ecological traits in this area have shown that both parental species are in an apparent equilibrium: none of them could spread in to the area of the other because of lesser competitive ability and hybrids have a better performance than parental species, i.e. they are more abundant and have less road-mortality (Martínez-Freiría et al., unpublished data). The northern part of the Iberian Peninsula comprises a strong transition between Atlantic and Mediterranean bioclimates (Rivas-Martínez & Díaz, 2004; Rivas-Martínez 2005). The needs of the parental forms often produce two peaks in close proximity as response to a variable, while the hybrids are transverse to both peaks, indicating a transitional habitat. This is the case of the annual precipitation, distance to needle-leaved or broadleaved deciduous forests. Other variables indicate a potential sympatry area. For instance, slope gives evidence of steeper areas as a potential habitat for the parental forms and hybrids, sharing the same niche. Thus, some environmental factors enhance spatial exclusion and constrain distribution to spatially non-overlapping ranges, while others allow contact between forms.

Humid areas are important to limit the presence of hybrids while both parental forms inhabit in the vicinities of these areas. This is coherent with the Rudrón river acting as a tension zone between the two vipers. The ecological model for the hybrids clearly exhibits an ecotone and suggests the potential expansion of hybrids along river basin. The presence of a transitional habitat receives additional support through the significant differences between the three divisions of the transect along environmental gradients.

The presence of an ecotone and low introgression between *V. latastei* and *V. aspis* species in addition to the absence of hybrids outside the ecotone suggests low viability of the hybrids and an *hybrid sink* effect in the hybrid zone (Barton 1980). The contact zone occurs in one area where none of the parentals have an advantage and where hybrids are produced. In the High Ebro, comparative ecological traits among parental species and hybrids have revealed similar patterns: hybrids have an intermediate reproductive success but a good performance in the hybrid zone. Moreover, competition among the three forms should be high but spatial and temporal segregation seems to be reducing competitive interactions (Martínez-Freiría, et al., unpublished data). However, the gene flow between these two species finds a strong barrier in this area. This is visible as a strong division, both morphological and genetic, between the two species in this area. Nevertheless, a high mortality rate among parental forms could be causing disequilibria among

parental species and favouring interspecific or hybrid-parental mates (Martínez-Freiría et al., unpublished data).

Conclusions

The combination of molecular and modelling approaches revealed a successful and effective tool for studying the interaction among species and environment in the hybrid zone of the High Ebro. This methodology could be used in the study of other hybrid zones in Iberian Peninsula among other taxa such as grasshoppers (Ritchie et al., 2001), salamanders (Sequeira et al., 2005), lizards (Pinho et al., 2008) and hares (Melo-Ferreira et al., 2007).

The northern Iberia configures as an interesting area for hybridization studies. The transition between two major bioclimates and the complex topography crossed by many rivers boost the presence of contact zones with the production of hybrids. The viper case has an interesting contact area that occurs in an extensive line that crosses the northern Iberia (Martínez-Freiría et al., 2009) and it coincides with other hybrid zones with the same north-south pattern (Bridle, 2001; Melo-Ferreira et al., 2007). This suggests that further studies on these vipers, may yield some knowledge of this evolutionary process in one interesting glacial refuge. Therefore, we consider that the extension of the sampling in all contact area would be of great advantage in future studies. Additionally, increasing the number of microsatellites with some developed specifically for these species along with more transects would benefit studies of hybridization.

Acknowledgements

This study was partially supported by project POCTI/BIA-BDE/55596/2004 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal). FMF was supported by a PhD grant (AP2003-2633) from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). JCB has a contract (Programme Ciência 2007) from FCT (Portugal). Authors acknowledge “Asociación Sociocultural Hoces del Alto Ebro y Rudrón” (Burgos, Spain) and also the many friends who helped with the field work in the High Ebro.

References

- Arnold, M.L. (1997). *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press. New York.
- Austin, M.P. (1987). Models for the analysis of species' response to environmental gradients. *Vegetation* **69**: 35-45.
- Barton, N.H. (1980). The hybrid sink effect. *Heredity* **44**: 277-278.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113-148.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**: 497-503.

- Bea, A. (1985). La repartición de las víboras *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) y *Vipera seoanei* (Lataste, 1879) en el País Vasco. *Cuadernos de sección, Cienc. Nat., Eusko Ikaskunz* **2**: 7-20.
- Blum, M.J. (2008). Ecological and genetic associations across a *Heliconius* hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 330-341.
- Bridle, J.R., Baird, S.J., Butlin, R.K. (2001). Spatial structure and habitat variation in a grasshopper hybrid zone. *Evolution* **55**: 1832-43.
- Brito, J.C., Crespo, E.G. (2002). Distributional analysis of two vipers (*Vipera latastei* and *V. seoanei*) in a potential area of sympatry in the Northwestern Iberian Peninsula. Pp. 129-138. In: *Biology of the Vipers*. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.). Eagle Mountain Publishing, Utah.
- Brown, J.H., Mehlman, D.W., Stevens, G.C. (1995). Spatial Variation in Abundance. *Ecology* **76**: 2028-2043.
- Burke, J.M., Arnold, M.L. (2001). Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review Genetics* **35**: 31-52.
- Carlsson, M., Isaksson, M., Höggren, M., Tegelström, H. (2003). Characterization of polymorphic microsatellite markers in the adder, *Vipera berus*. *Molecular Ecology Notes* **3**: 1-3.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species*. Literature.org, authors, Charles Darwin. <http://www.literature.org/authors/darwin-charles/the-origin-of-species/>
- Duguy, R., Martínez-Rica, J.P., Saint-Girons, H. (1979). La répartition des vipères dans les Pyrénées et les régions voisines du nord de l'Espagne. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* **115**: 359-377.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-87.
- Garrigues, T., Dauga, C., Ferquel, E., Choumet, V., Failloux, A.-B. (2005). Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**: 35-47.
- Gay, L., Crochet, P., Bell, D.A., Lenormand, T. (2008). Comparing clines on molecular and phenotypic traits in hybrid zones: a window on tension zone models. *Evolution* **62**: 2789-806.
- Gifford, M.E. (2008). Divergent character clines across a recent secondary contact zone in a Hispaniolan lizard. *Journal of Zoology* **274**: 292-300.
- Hewitt, G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965-1978. <http://www.worldclim.org/>
- Kozak, K.H., Graham, C.H., Wiens, J.J. (2008). Integrating GIS-based environmental data into evolutionary biology. *Trends in ecology and evolution* **23**: 141-8.

- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., Joger, U. (2001). Evolutionary Relationships among the True Vipers Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**: 94-104.
- Luiselli, L. (2006). Resource partitioning and interspecific competition in snakes: the search for general geographical and guild patterns. *Oikos* **114**: 193-211.
- Luiselli, L., Filippi, E., Di Lena, E. (2007). Ecological relationships between sympatric *Vipera aspis* and *V. ursinii* in High-Altitude habitats of Central Italy. *Journal of Herpetology* **41**: 378-384.
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M. (2005). Cluster Analysis Basics and Extensions. Cluster R package version 1.11.11
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* **20**: 229-37.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature* **446**: 279-83.
- Martínez-Freiría, F., Brito, J.C., Lizana, M. (2006). Intermediate forms and syntopy among vipers (*V. aspis* and *V. latastei*) in Northern Iberian Peninsula. *Herpetological Bulletin* **97**: 14-18.
- Martínez-Freiría, F., Sillero, N., Lizana, M., Brito, J.C. (2008). GIS-based niche models identify environmental correlates sustaining a contact zone between European vipers. *Diversity and Distributions* **14**: 452-461.
- Martínez-Freiría, F., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Lizana, M., Brito, J.C. (2009): Geographical patterns of morphological variation and environmental correlates in contact zones: a multi-scale approach using two Mediterranean vipers. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. doi:10.1111/j.14390469.2008.00506.x
- Mebert, K. (2008). Good species despite massive hybridization: genetic research on the contact zone between the watersnakes *Nerodia sipedon* and *N. fasciata* in the Carolinas, USA. *Molecular Ecology* **17**: 1918-1929.
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Randi, E.A. (2007). The rise and fall of the mountain hare. *Lepus timidus*, *Molecular Ecology* **16**: 605- 618.
- Monney, J.-C. (1996). *Biologie comparée de Vipera aspis L. et de Vipera berus L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes Bernoises*. PhD Thesis. Institute of Zoology, Faculty of Sciences, University of Neuchatel, Neuchatel, Switzerland.
- Moore, W. (1977). An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *The Quarterly Review of Biology* **52**: 263-277.
- Pebesma, E.J., Wesseling, C.G. (1998). Gstat: a program for geostatistical modelling, prediction and simulation. *Computers and Geosciences* **24**: 17-31.
- Pinho, C., Harris, D.J., 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**: 63.
- 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.

- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- R Development Core Team (2009). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Reudink, M.W. (2007). Structure and dynamics of the hybrid zone between Black-capped chickadee (*Poecila atricapillus*) and Carolina chickadee (*P. carolinensis*) in Southeastern Pennsylvania. *The Auk* **124**: 463-478.
- Ritchie, M.G., Kidd, D.M., Gleason, J.M. (2001). Mitochondrial DNA variation and GIS analysis confirm a secondary origin of geographical variation in the bushcricket *Ephippiger ephippiger* (Orthoptera: Tettigonioidea), and resurrect two subspecies. *Molecular Ecology* **10**: 603-611.
- Rivas-Martínez, S. (2005). Mapa de Series, Geoseries y Geopermaseries de Vegetación de España, Parte 1. Pp. 1-28. In: *Memoria del Mapa de Vegetación Potencial de España*.
- Rivas-Martínez, S., Díaz, A. P. (2004). *Biogeographic Map of Europe*. Cartographic Service, University of León. Spain.
- Saint-Girons, H. (1975). Coexistence de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un probleme de competition interspecifique. *Terre et Vie* **29**: 590-613.
- Saint-Girons, H. (1980). Biogéographie et évolution des vipères européennes. *C.R. Société Biogéographique* **496**: 146-172.
- Saint-Girons, H. (1990a). Morphologie comparée des hybrides de *Vipera seoanei* Lataste, 1879 x *Vipera aspis* (L.). *Amphibia-Reptilia* **11**: 197-200.
- Saint-Girons, H. (1990b). Croissance, maturité sexuelle et variations ontogéniques des periods d'alimentation et des mues chez deux vipers hybrids (*Vipera aspis* x *Vipera seoanei*) dans des conditions semi-naturelles. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **54**: 62-68.
- Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in ecology and evolution* **19**: 198-207.
- Sequeira, F., Alexandrino, J., Rocha, S., Arntzen, J.W., Ferrand, N. (2005). Genetic exchange across a hybrid zone within the Iberian endemic golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*. *Molecular Ecology* **14**: 245-254.
- Storfer, A., Murphy, M.A., Evans, J.S., Goldberg, C.S., Robinson, S., Spear, S.F. (2007). Putting the "landscape" in landscape genetics. *Heredity* **98**: 128-42.
- Swenson, N. G. (2008). The past and future influence of geographic information systems on hybrid zone, phylogeographic and speciation research. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 421-34.
- Teeter, K.C., Payseur, B.A., Harris, L.W., Bakewell, M.A., Thibodeau, L.M., O'Brien, J.E., Krenz, J.G., Sans-Fuentes, M.A., Nachman, M.W., Tucker, P.K. (2008). Genome-wide patterns of gene flow across a house mouse hybrid zone. *Genome Research* **18**: 67-76.
- Wiens, J.J., Graham, C.H. (2005). Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 519-539.
- Zuffi, M.A.L., Gentilli, A., Razzetti, E., Scali, S. (2001). Transition-hybridisation areas in parapatric *Vipera aspis* subspecies from northern Italy. *Biota* **2**: 52.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

Los resultados más importantes de los capítulos 2 al 7 que conforman esta tesis doctoral aparecen reflejados en la Tabla 1. En base a estos datos se establecen las siguientes conclusiones:

1. La distribución a escala local de las tres especies de víboras ibéricas en la zona de contacto del Alto Ebro es de tipo alopátrico. Cada una de las especies se restringe a una zona y a un tipo de hábitat más o menos diferente: *V. seoanei* ocupa la zona norte y noroeste, más plana y húmeda, con influencia atlántica, *V. aspis* ocupa el noreste y centro, de elevada pendiente y vegetación herbácea, con influencia mediterránea húmeda y *V. latastei* la mitad sur, de elevada pendiente, vegetación herbácea y más seca, con influencia mediterránea sub-húmeda.
2. El par de especies Mediterráneas, *V. aspis* – *V. latastei*, muestra cierta similitud en los hábitats ocupados, por lo que sus distribuciones locales se solapan en una zona de simpatría en el curso medio-bajo del río Rudrón, donde coexisten ejemplares típicos y otros con características morfológicas intermedias entre las dos especies, en cuanto al número de escamas apicales, intercantales e intrasupraoculares y ventrales, y marcas dorsales.
3. La selección de hábitats diferentes constituye una barrera para el flujo genético entre especies Eurosiberianas (*V. seoanei*) y Mediterráneas, pero no entre las dos especies Mediterráneas: la mayoría de los ejemplares con características morfológicas intermedias entre *V. aspis* y *V. latastei* son híbridos entre estas dos especies.
4. Existe un patrón geográfico de convergencia morfológica entre *V. aspis* y *V. latastei* en la zona de simpatría. Este fenómeno parece ser debido por un lado a una adaptación local a similares condiciones ambientales y por otro a un fenómeno de hibridación e intercambio genético.
5. En la zona de simpatría, *V. aspis*, *V. latastei* y los híbridos tienen nichos muy similares (hábitats, micro-hábitats y dieta muy similares), por lo que coexisten bajo un escenario de fuerte competencia interespecífica.
6. No obstante, la segregación del nicho en los ejes espacial y temporal (selección de micro-hábitat, tasa de movimiento y variación del área vital a lo largo del ciclo de actividad) parece estar disminuyendo las interacciones competitivas y permitiendo la coexistencia.

7. La zona de simpatría se corresponde con una zona de transición en las condiciones térmicas que conforman los hábitats utilizados por las víboras. Los híbridos son más termófilos y seleccionan hábitats térmicos intermedios entre las especies parentales. El área de simpatría parece ser demasiado cálida y fría para *V. aspis* y *V. latastei*, respectivamente; por lo que los híbridos parecen tener ventajas en los ambientes térmicos que existen en la zona híbrida.
8. El uso diferencial de los recursos en la zona de simpatría parece causar desventajas reproductivas y demográficas en *V. aspis* y *V. latastei*, respectivamente. La baja fecundidad de la primera y la alta mortalidad de la segunda sugieren la existencia de un balance entre las dinámicas poblacionales de ambas especies a lo largo de la zona de transición ambiental. Por lo tanto, ninguna de las especies sería capaz de dispersarse en el área de distribución alopátrica de la otra puesto que sería competitivamente inferior.
9. La zona de simpatría se ajusta a un modelo de zona híbrida de tensión, en la que los híbridos, pese a tener una eficacia reproductiva intermedia entre *V. aspis* y *V. latastei*, se desenvuelven mejor que las especies parentales en la zona de transición ambiental pero no fuera de ésta. Por lo tanto, las características de ecotono de la zona híbrida crean una barrera para la dispersión y el intercambio genético de las dos especies.

Tabla 1. Resumen de los principales resultados de los capítulos 2, 3, 4, 5, 6 y 7. (* datos actualizados; M, criterio morfológico, capítulo 3; G, criterio genético, capítulo 7; D, distancia; SVL, longitud hocico-cloaca; NSB, número de neonatos nacidos muertos; NMAP, número de neonatos que mudaron tras el parto; NWFS, número de neonatos que conservaron fragmentos de muda; DE, desviación estándar; T_{sel}, temperatura intrínseca; T_b, temperatura corporal en el campo; T_e, temperaturas ambientales operativas; d_e, calidad térmica del hábitat).

	<i>V. aspis</i>	Híbridos VAxVL	<i>V. latastei</i>	<i>V. seoanei</i>	Capítulo
Distribución y hábitat					
Área de distribución (Km ²)					
observada	49	13	57	19	2* / 7
potencial (M)	360	-	141	165	3
potencial (G)	147	75	132	100	7
Distribución local	Noreste y centro	Centro	mitad Sur	Norte y Noroeste	2 / 3 / 7
Tipo de distribución	alopátrica	simpátrica	alopátrica	alopátrica	2 / 3 / 7
Hábitat seleccionado	Mediterráneo húmedo	transición húmedo-subhúmedo	Mediterráneo subhúmedo	Atlántico	2 / 7
Factores ambientales (M)					3
Evapotranspiración (mm)	> 620	-	620 - 660	> 620	
Pendiente (°)	> 10	-	> 10	0 - 10	
Precipitación (mm/año)	>700	-	<750	>700	
Factores ambientales (G)					7
D vegetación herbácea (m)	0 - 15000	0 - 20000	0 - 15000	-	
D encinares (m)	0 - 2000	-	-	2000 - 10000	
D áreas húmedas (m)	0 - 3000	0 - 1000	-	-	
Precipitación (mm/año)	-	-	<750	>700	
Área de simpatria (Km ²)					2* / 3 / 7
observada / potencial (M) / potencial (G)					
<i>V. aspis</i>	-	11 / - / 16	9 / 76 / 28	0 / 22 / -	
Híbridos VA x VL	11 / - / 16	-	7 / - / 16	0 / 0 / -	
<i>V. latastei</i>	9 / 76 / 28	7 / - / 16	-	1 / 2 / -	
<i>V. seoanei</i>	0 / 22 / -	0 / 0 / -	1 / 2 / -	-	
Sintopía					2*
<i>V. aspis</i>	-	si	si	no	
Híbridos VA x VL	si	-	si	no	
<i>V. latastei</i>	si	si	-	no	
<i>V. seoanei</i>	no	no	no	-	
Morfología -media (rango)-					4
N apicales	2.29 (2-4)	3.06 (2-5)	4.35 (2-7)		
N interc+intrasup en hembras	23.68 (10-43)	27.98 (16-38)	29.73 (15-47)		
N interc+intrasup en machos	22.88 (13-57)	25.30 (13-45)	28.37 (15-42)		
N marcas dorsales	55.89 (42-78)	48.71 (32-64)	42.16 (33-57)		
N ventrales en hembras	147.48 (136-157)	145.80 (140-155)	139.93 (129-148)		
N ventrales en machos	145.73 (136-159)	143.25 (136-151)	140.36 (132-149)		

Conclusiones - Conclusions

	<i>V. aspis</i>	Híbridos VAxVL	<i>V. latastei</i>	<i>V. seoanei</i>	Capítulo
Dieta					5
Composición (%)					
Invertebrados	0	3.57	4.17		
Reptiles	8.11	10.71	14.58		
Mamíferos	91.89	85.71	81.25		
Amplitud de Nicho					
Índice de Levin	0.22	0.33	0.44		
Solapamiento de Nicho					
Índice de Pianka					
<i>V. aspis</i>	-	0.99	0.93		
<i>V. latastei</i>	0.93	0.95	-		
Híbridos VA x VL	0.99	-	0.95		
Frecuencia de consumo (%)	19.68	30.11	26.67		
Período de alimentación	MAR-NOV	ABR-OCT	MAR-OCT		
Micro-hábitat					5
Primavera					
Arbustos (β)	0.06	-	0.17		
Piedras (β)	0.07	0.11	0.27		
Árboles (β)	-	0.2	0.14		
Verano					
Arbustos (β)	0.12	0.07	0.1		
Piedras (β)	0.08	-	-		
Suelo desnudo (β)	-	0.24	-		
Árboles (β)	0.13	0.05	-		
Otoño					
Arbustos (β)	0.22	0.18	0.12		
Pendiente (β)	3.46	-	4.81		
Árboles (β)	0.08	-	-		
Actividad					5
AMR (m/día)					
ENE-FEB	0.36	1.44	19.55		
MAR-ABR	36.80	5.56	59.26		
MAY-JUN	27.64	13.32	24.83		
JUL-AGO	11.49	13.76	0		
SEP-OCT	28.00	43.05	49.66		
NOV-DIC	4.84	18.74	5.08		
Área vital media (m ²)					
ENE-FEB	0	1.01	2243.72		
MAR-ABR	3365.64	275.07	162.87		
MAY-JUN	5032.72	2200.49	12221.81		
JUL-AGO	429.40	709.46	0		
SEP-OCT	23149.05	8149.12	4844.99		
NOV-DIC	455.92	5725.87	1454.91		

	<i>V. aspis</i>	Híbridos VAxVL	<i>V. latastei</i>	<i>V. seoanei</i>	Capítulo
Reproducción					5
Período de cópula detectado	ABRIL	MARZO	ABRIL		
Fecundidad -media (DE)-					
N folículos	7.39 (2.56)	8.80 (1.44)	8.80 (1.52)		
N embriones	5.75 (2.55)	5.6 (1.67)	7.7 (2.45)		
Esfuerzo reproductor	0.59 (0.24)	0.79 (0.28)	0.74 (0.13)		
Neonatos -media (DE)-					
SVL (mm)	165.86 (11.09)	157.58 (19.36)	152.42 (7.85)		
Peso (g)	5.28 (0.88)	4.75 (1.28)	4.8 (0.87)		
NSB	0.75 (0.44)	0.83 (0.39)	0.94 (0.23)		
NMAP	0.61 (0.50)	0.50 (0.52)	0.81 (0.39)		
NWFS	0.14 (0.36)	0	0		
Frecuencia de reproducción (%)					
Media (DE)	30.8 (28.23)	40.3 (34.92)	40.1 (22.8)		
Demografía					5
Abundancia relativa (individuos/Km)					
Hembras	0.48	0.95	0.53		
Machos	0.37	1.75	0.85		
Juveniles	0.16	0.16	0.48		
Mortalidad en la carretera (individuos/Km)					
Hembras	0.00	0.21	0.48		
Machos	0.28	0.28	0.07		
Juveniles	0.28	0.62	0.90		
Termorregulación					6
Características térmicas (Hembras)					
Individuos					
T _{sel} -media (DE)- (°C)	28.47 (0.63)	31.27 (1.26)	25.71 (0.33)		
T _b -media (DE)- (°C)	25.89 (10.19)	27.52 (9.31)	26.07 (9.06)		
Hábitat					
Variación de T _e	frío	cálido	cálido		
Variación de d _e	poca amplitud	amplitud moderada	gran amplitud		

The most important results from chapters 2 to 7 are included in Table 1. Attending these data it can be concluded that:

1. The distribution at local scale of the three viper species in the High Ebro contact zone is allopatric. Each species is restricted to an area and occurs in a more or less distinct habitat: *V. seoanei* in Northern and North-western, more flat and humid and with Atlantic influence; *V. aspis* in North-eastern and Central, very steep, with herbaceous vegetation and humid Mediterranean influence; *V. latastei* in Southern, very steep, with herbaceous vegetation, but dryer and with sub-humid Mediterranean influence.
2. The Mediterranean species, *V. aspis* and *V. latastei*, occupy similar habitats, thus, their distributions overlap in a sympatry area in the middle-lower Rudrón river. In this area coexist typical and morphological intermediate specimens between the two species, regarding number of apical, intercantal plus intrasupraocular and ventral scales, and dorsal marks.
3. Different habitat selection acts as a barrier to gene flow between Eurosiberian (*V. seoanei*) and Mediterranean species, but not among Mediterranean species: most intermediate vipers are hybrids among *V. aspis* and *V. latastei*.
4. There is a geographic pattern of morphological convergence between *V. aspis* and *V. latastei* in the sympatry area. This phenomenon is due to a local adaptation to similar environmental conditions, but also to hybridization and gene flow.
5. In the sympatry area, *V. aspis*, *V. latastei* and hybrids have similar ecological niches (habitats, micro-habitats and diet); thus, vipers coexist under a high interspecific competition scenario.
6. Nevertheless, niche segregation on the spatial and temporal axes (micro-habitat selection, movement rate and home range size variation throughout the annual cycle) seems to be reducing interspecific interactions and allowing coexistence.

7. The sympatry area corresponds to a transition in thermal conditions which conforms with the habitats selected by the vipers. Hybrids are more thermophilic and select intermediate thermal habitats than parental species. The sympatry area seems to be too warm for *V. aspis* and too cool for *V. latastei*; thus, hybrids might have advantages in the thermal-transition habitats.
8. Differential use of resources in the sympatry area seems to be causing reproductive and demographic disadvantages in *V. aspis* and *V. latastei*, respectively. Lower fecundity in the former and higher mortality in the latter suggest the occurrence of balance effect between both population dynamics throughout the transitional environmental area. Thus, both species are not able to spread into the allopatric ranges of the other species, because they would be less competitive than the other species.
9. The sympatry area fits a hybrid tension-zone model: hybrids, despite of having intermediate reproductive fitness between *V. aspis* and *V. latastei*, they are more abundant and have lower mortality than parental species in the transitional environmental zone, but not out of it. Therefore, the ecotone characteristics of the hybrid zone create a barrier to dispersal and gene flow between Mediterranean species.

Table 1. Summary of major results of chapters 2, 3, 4, 5, 6 and 7. (* actualized data; M, morphological criteria, chapter 3; G, genetic criteria, chapter 7; D, distance to; Avg, Average; SVL, snout-vent length; NSB, number of stillborn elements; NMAP, number of moulted newborns after parturition; NWFS, number of newborns with fragments of skin after moult; SD, standard deviation; T_{sel}, intrinsic temperature; T_b, field body temperature; T_e, operative environmental temperatures; d_e, thermal quality of the habitat).

	<i>V. aspis</i>	Hybrids VAxVL	<i>V. latastei</i>	<i>V. seoanei</i>	Chapter
Distribution and habitats					
Area of distribution (Km ²)					
observed	49	13	57	19	2* / 7
potential (M)	360	-	141	165	3
potential (G)	147	75	132	100	7
Local distribution	North-eastern and central	central	Southern	North and North-western	2 / 3 / 7
Type of distribution	allopatric	sympatric	allopatric	allopatric	2 / 3 / 7
Selected habitats	Humid Mediterranean	Humid—sub-humid transition	Sub-humid Mediterranean	Atlantic	2 / 7
Environmental factors (M)					3
Evapotranspiration (mm)	> 620	-	620 - 660	> 620	
Slope (°)	> 10	-	> 10	0 - 10	
Precipitation (mm/year)	>700	-	<750	>700	
Environmental factors (G)					7
D herbaceous veg. (m)	0 - 15000	0 - 20000	0 - 15000	-	
D evergreen forests (m)	0 - 2000	-	-	2000 - 10000	
D humid areas (m)	0 - 3000	0 - 1000	-	-	
Precipitation (mm/year)	-	-	<750	>700	
Sympatry area (Km ²)					2* / 3 / 7
observed / potential (M) / potential (G)					
<i>V. aspis</i>	-	11 / - / 16	9 / 76 / 28	0 / 22 / -	
Hybrids VA x VL	11 / - / 16	-	7 / - / 16	0 / 0 / -	
<i>V. latastei</i>	9 / 76 / 28	7 / - / 16	-	1 / 2 / -	
<i>V. seoanei</i>	0 / 22 / -	0 / 0 / -	1 / 2 / -	-	
Syntopy					2*
<i>V. aspis</i>	-	yes	yes	no	
Hybrids VA x VL	yes	-	yes	no	
<i>V. latastei</i>	yes	yes	-	no	
<i>V. seoanei</i>	no	no	no	-	
Morphology –Avg (range)-					4
N apicals	2.29 (2-4)	3.06 (2-5)	4.35 (2-7)		
N interc+intrasup in females	23.68 (10-43)	27.98 (16-38)	29.73 (15-47)		
N interc+intrasup in males	22.88 (13-57)	25.30 (13-45)	28.37 (15-42)		
N dorsal marks	55.89 (42-78)	48.71 (32-64)	42.16 (33-57)		
N ventrals in females	147.48 (136-157)	145.80 (140-155)	139.93 (129-148)		
N ventrals in males	145.73 (136-159)	143.25 (136-151)	140.36 (132-149)		

Conclusiones - Conclusions

	<i>V. aspis</i>	Hybrids VAxVL	<i>V. latastei</i>	<i>V. seoanei</i>	Chapter
Diet					5
Composition (%)					
Invertebrates	0	3.57	4.17		
Reptiles	8.11	10.71	14.58		
Mammals	91.89	85.71	81.25		
Niche breadth					
Levin's index	0.22	0.33	0.44		
Niche overlap					
Pianka's index					
<i>V. aspis</i>	-	0.99	0.93		
<i>V. latastei</i>	0.93	0.95	-		
Hybrids VAxVL	0.99	-	0.95		
Feeding frequency (%)	19.68	30.11	26.67		
Feeding period	MAR-NOV	APR-OCT	MAR-OCT		
Micro-habitats					5
Spring					
Bushes (β)	0.06	-	0.17		
Rocks (β)	0.07	0.11	0.27		
Trees (β)	-	0.2	0.14		
Summer					
Bushes (β)	0.12	0.07	0.1		
Rocks (β)	0.08	-	-		
Soil (β)	-	0.24	-		
Trees (β)	0.13	0.05	-		
Autumn					
Bushes (β)	0.22	0.18	0.12		
Slope (β)	3.46	-	4.81		
Trees (β)	0.08	-	-		
Activity					5
AMR (m/day)					
JAN-FEB	0.36	1.44	19.55		
MAR-APR	36.80	5.56	59.26		
MAY-JUN	27.64	13.32	24.83		
JUL-AUG	11.49	13.76	0		
SEP-OCT	28.00	43.05	49.66		
NOV-DEC	4.84	18.74	5.08		
Home range size (m ²)					
JAN-FEB	0	1.01	2243.72		
MAR-APR	3365.64	275.07	162.87		
MAY-JUN	5032.72	2200.49	12221.81		
JUL-AUG	429.40	709.46	0		
SEP-OCT	23149.05	8149.12	4844.99		
NOV-DEC	455.92	5725.87	1454.91		

	<i>V. aspis</i>	Hybrids VAxVL	<i>V. latastei</i>	<i>V. seoanei</i>	Chapter
Reproduction					5
Detected mating period	APRIL	MARCH	APRIL		
Fecundity -Avg (SD)-					
N follicles	7.39 (2.56)	8.80 (1.44)	8.80 (1.52)		
N embryos	5.75 (2.55)	5.6 (1.67)	7.7 (2.45)		
Reproductive effort	0.59 (0.24)	0.79 (0.28)	0.74 (0.13)		
Newborns -Avg (SD)-					
SVL (mm)	165.86 (11.09)	157.58 (19.36)	152.42 (7.85)		
Weight (g)	5.28 (0.88)	4.75 (1.28)	4.8 (0.87)		
NSB	0.75 (0.44)	0.83 (0.39)	0.94 (0.23)		
NMAP	0.61 (0.50)	0.50 (0.52)	0.81 (0.39)		
NWFS	0.14 (0.36)	0	0		
Frequency of reproduction (%)					
Avg (SD)	30.8 (28.23)	40.3 (34.92)	40.1 (22.8)		
Demography					5
Relative abundance (specimens/Km)					
Females	0.48	0.95	0.53		
Males	0.37	1.75	0.85		
Juveniles	0.16	0.16	0.48		
Road mortality (specimens/Km)					
Females	0.00	0.21	0.48		
Males	0.28	0.28	0.07		
Juveniles	0.28	0.62	0.90		
Thermoregulation					6
Thermal characteristics (Females)					
Individual					
T _{sel} -Avg (SD)- (°C)	28.47 (0.63)	31.27 (1.26)	25.71 (0.33)		
T _b -Avg (SD)- (°C)	25.89 (10.19)	27.52 (9.31)	26.07 (9.06)		
Habitat					
T _e variation	cool	warm	warm		
d _e variation	low	moderate	high