

Diversidad genética
e historia biogeográfica
de endemismos
del género *Podarcis*
en tres archipiélagos
del Mediterráneo Occidental



Virginia Rodríguez Delgado

Tesis Doctoral

2014





**Universitat de les
Illes Balears**

TESIS DOCTORAL

2014

Programa de Doctorado en Biología

**DIVERSIDAD GENÉTICA
E HISTORIA BIOGEOGRÁFICA
DE ENDEMISMOS
DEL GÉNERO *PODARCIS*
EN TRES ARCHIPIÉLAGOS DEL
MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL**

Virginia Rodríguez Delgado

Directora: Dra. Cori Ramon Juanpere

Director: Dr. José Aurelio Castro Ocón

Doctora por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

Dra. Cori Ramon Juanpere y Dr. José Aurelio Castro Ocón, ambos Catedráticos de Genética de la Universitat de les Illes Balears.

DECLARAMOS:

Que la tesis doctoral que lleva por título “**Diversidad genética e historia biogeográfica de endemismos del género *Podarcis* en tres archipiélagos del Mediterráneo Occidental**”, presentada por Virginia Rodríguez Delgado para la obtención del título de Doctora en Biología, ha sido desarrollada por ella, bajo nuestra supervisión, en el área de Genética de la Universitat de les Illes Balears.

Y para que quede constancia de ello firmamos este documento.

Palma, 11 de Diciembre de 2014

Dra. Cori Ramon Juanpere

Dr. José Aurelio Castro Ocón

*A la persona más valiente...
Virginia Delgado García,
... mi madre*

Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender

Marie Curie

---AGRADECIMIENTOS---

"Es de bien nacida, ser agradecida" es uno de esos refranes que resuenan en mi cabeza y acuden automáticamente sin ser llamados, indicativo de que me lo han repetido hasta la saciedad. Creo que he actuado en consonancia, pero mejor dejar constancia por escrito; por eso quiero dar las gracias a todos los que me han apoyado mientras yo me dedicaba a ésta, mi pequeña aportación a la Ciencia.

Querría empezar por mis directores: Dra. Cori Ramon y Dr. José Aurelio Castro. Hay dos cosas que siempre he tenido claras, dos objetivos: quería ser doctora y quería hacer la tesis en genética humana. Cori, tú me "recidaste" y poco a poco me atrajiste hacia las sargantanas y la filogeografía; posición en la que no me sentía cómoda y que no creía capaz de defender, sin embargo, aquí estoy ¡Muchas gracias por confiar en mí! ¡Ha sido todo un reto! Pepe, las visitas al seminario antes de irte para comentar mis avances o preguntarme como estoy, han dado pie a interesantes conversaciones y revelado que, tú y yo, "clusteramos" juntos, ¡muchas gracias por todo! Dra. Antònia Picornell, desde que me aceptaste como alumna colaboradora he intentado estar a la altura, instándome a ir más allá. ¡Gracias por todo, Antònia! Es imposible no contagiarse del cariño que la Dra. Bàrbara Terrasa siente por las sargantanas Bàrbara, una aliada en esto de los programas ¡muchas gracias! ¡Gracias a todos por nuestro apoyo! juntos hemos compartido grandes momentos.. espero que alguno de ellos quede registrado en el repertorio oficial de genética (con el condor pasa, Kuwait, Vivir... o aquella vez que...). Genética ha sido mi casa durante muchos años.

Entré en el grupo antes de licenciarme, siendo alumna colaboradora y he ido enlazando diferentes becas y contratos de técnico (gracias por

todos ellos), a la vez que tocaba diferentes temas.. algunos que llegaban a buen puerto y otros que se quedaban en el tintero...trastorno bipolar, xarxa de desórdenes mentales, depresión post-parto, pruebas de paternidad, cromosoma Y en poblaciones mediterráneas, ADN antiguo, cáncer de vejiga,.. El camino ha sido largo hasta llegar a las sargantanas, la beca pre-doctoral y mi tesis, pero hay tramos en los que he viajado bien acompañada. En este tiempo he compartido el laboratorio y el seminario con muchos compañeros que han ido yendo y viniendo: Carmen (maestra, amiga), Paloma (me pasaste el testigo), Amón (¡¡aquellos maravillosos años!!), Herman, Óscar, John, Pedro, Heriberto, José (¡¡Eres un Crack!! Me quito el sombrero), Marina (cuando éramos sólo dos), Anabel, Antonia, Noelia, Anabella, Mar, Juan y Dani (nunca, nunca me he reído tanto en el laboratorio, como con vosotros, ¡suerte!), David (si fueras un buen amigo....), Eva, Joana Francisca (yo también quiero...), Joana Maria (el testigo ahora es tuyo), Kaoutar, Mercedes (¡pon la musiquita!), Marta, Andreu, Bea (un ejemplo claro de que si quieres, puedes), Carme, Sergio,.. ¡¡Muchísimas gracias a todos por tantos momentos compartidos!! ¡¡Suerte a las que ahora os toca defender el fuerte!

Físicamente no están en Genética, pero forman parte del equipo: Dr. Valentín Pérez-Mellado y Dr. Richard P. Brown. Dado que eres el herpetólogo del grupo, poco podría hacer sin ti, Valentín, pero además, has permanecido accesible y dispuesto a solucionar mis dudas a ouelta de correo. Richard, cicerone de este mundo alternativo poblado de distribuciones y modelos evolutivos. No sólo aprendí muchísimo durante la estancia en Liverpool, sino que con paciencia has ido esclareciendo todos los problemas que te he ido planteando en este tiempo. ¡Muchas gracias a los dos!

Para sanjar la parte científica quiero agradecer el haber completado mi formación, en uno u otro aspecto, a: Dr. Eduard Petitpierre, Dr. Carlos Juan, Dr. Joan Pons, Dra. Carmen Tomás, Dra. Meritxel Genovart, Dr.

Daniel Oro, Dr. Javier Juste, Dra. Ana M^a González, Dr. Vicente M. Cabrera, Dra. Rosa Fregel, Dra. Blanca Espinet y Dra. Marta Salido. ¡Muchas gracias! También agradecer a los becarios de otras áreas, destacando a los del IJISC, que me ayudaron con Nuredaluna y se invitaron a alguna que otra caña: María (suerte), Juan (¿doctores??)... Y, por supuesto, al resto del personal de la UIB, en especial a Pep Miquel, que lo arregla todo, a Trinidad (¡gracias por facilitarme las cosas!) y a Macià y Charo...por esos "oo y a cerrar el edificio, ¿tienes llave?" o "¿es que no tienes casa?, oete ya". ¡Gracias!

Asimismo, mi gratitud a la Conselleria d'Innovació, Interior i Justícia (Govern de les Illes Balears) y al Fondo Social Europeo por la beca predoctoral concedida a mi persona en 2009, y a Fondos FEDER y al Ministerio Español de Economía y Competitividad por la financiación de proyectos de investigación al grupo de Genética y por ende, mi tesis ¡Gracias!

No puedo seguir este apartado sin agradecer su "participación" a las protagonistas indiscutibles de esta tesis, las lagartijas así como a los fotógrafos que nos las acercan y permiten que las apreciemos con todo lujo de detalles. Gracias Bárbara Terrasa, Jordi Serapio y Peter Oefinger por cederme algunas de vuestras impresionantes fotos para ilustrar esta tesis.

Los amigos.... la familia que se escoge. Los de siempre, los que te vas encontrando por el camino (esas catarsis) y los que se pueden contar con los dedos de la mano. Ainhoa, Rocío, Mercedes ... gracias por estar ahí para mí. A todos, gracias por escuchar, por los consejos, por las risas, por las lágrimas, por soportar mis desvaríos con la tesis (o desatenciones derivadas)... por todo. A la próxima, invito yo.

Si hay algo sobre lo que nunca he dudado es que la familia es lo más importante. ¡Gracias abuela, la palabra conoence, pero el ejemplo arrastra! Estoy muy agradecida por toda ouestra comprensión y apoyo, por ouestras enseñanzas, y por fomentar (o soportar) mi curiosidad (s/t tú, tito Pedro). ¡Gracias por estar ahí para mí! (y gracias Whatsapp por facilitarlo) ¡¡Somos familia!!!

Tamara, Eli..insportables algunas veces, imprescindibles.. todas, ¡gracias!

Oscar, iluminas nuestras vidas.. ¡gracias!

La perseverancia me ha traído hasta aquí. Mamá, gracias por introducir esa palabra en mi vocabulario y repetirla a lo largo de los años. Eres lo más importante, todo lo que soy, todo lo que he logrado, es por ti (bueno, y por la abuela). Gracias, gracias, gracias, gracias... por muchas veces que lo repita, nunca serán suficientes.

Por si me he dejado a alguien... gracias de nuevo a todos los que me habéis acompañado en este viaje, y, por qué no, también a aquellos que me lo han puesto difícil... sólo han conseguido que me esfuerce más, y llegue más lejos, ¡gracias!

Ayer es historia. Hoy es un regalo. Mañana es un misterio.

Virginia Rodríguez Delgado
Santa Ponsa, 2014

Podarcis es un género de reptiles incluido dentro de la familia Lacertidae, en el que se engloba las comúnmente denominadas lagartijas. La importancia de este grupo en el Archipiélago Balear no viene dada sólo porque constituyen un icono representativo de las islas, sino también porque las dos especies endémicas presentes en nuestras islas, la *sargantana balear* (*Podarcis lilfordi*) y la *sargantana pitiüsa* (*Podarcis pityusensis*), junto con el *ferreret* o sapillo balear (*Alytes muletensis*), son los únicos representantes de vertebrados pre-holocénicos en la actualidad. Ante esta perspectiva, el área de Genética de la Universidad de las Islas Baleares inicia una línea de trabajo en este género, que se ha mantenido y ampliado en el marco de esta (y otras) tesis.

Esta tesis presenta el estudio evolutivo de tres especies de *Podarcis* endémicas de archipiélagos del Mediterráneo: Islas Baleares (*P. pityusensis*), Archipiélago Maltés (*P. filfolensis*) y Archipiélago de Córcega y Cerdeña (*P. tiliguerta*), y su relación con una cuarta especie, *Podarcis lilfordi*, endémica del Archipiélago Balear e integrante, junto a las anteriores, del *Cluster* de Islas del Mediterráneo Occidental de *Podarcis*. En el transcurso de estas páginas se exponen los análisis y resultados obtenidos durante la investigación, así como las conclusiones derivadas. Cabe destacar que cuatro manuscritos son producto de esta tesis, tres de ellos publicados, así como que se presentaron resultados previos de los dos primeros en Congresos Internacionales:

- P. Bloor, V. Rodríguez, B. Terrasa, R. P. Brown, V. Pérez-Mellado, J. A. Castro, A. Picornell, M. M. Ramon. ***Polymorphic microsatellite loci for the Balearic Island Lizard Podarcis lilfordi (Squamata: Lacertidae)***. Conservation Genetics Resource (2011) 3: 323–325
- V. Rodríguez, R. P. Brown, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado, J. A. Castro, A. Picornell, M. M. Ramon. ***Multilocus genetic diversity and historical biogeography of the endemic wall lizard from Ibiza and Formentera, Podarcis pityusensis (Squamata: Lacertidae)***. Molecular Ecology (2013) 22: 4829–4841
- V. Rodríguez, R. P. Brown, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado, A. Picornell, J. A. Castro, M. M. Ramon. ***Genetic diversity and historical biogeography of the Maltese wall lizard, Podarcis filfolensis (Squamata: Lacertidae)***. Conservation Genetics (2014) 15: 295–304

- *A multilocus analysis of evolution of the endemic wall lizard Podarcis tiliguerta (Squamata: Lacertidae) from the Mediterranean islands of Corsica and Sardinia. En preparación.*

Tras una breve introducción al área de estudio, el grupo taxonómico, los marcadores moleculares seleccionados y las aproximaciones analíticas, se enumeran los objetivos del trabajo y se presentan materiales y métodos aplicados, y tras el despliegue de los resultados de la investigación en tres capítulos, éstos se discuten globalmente para destacar las conclusiones finales.

En el **Capítulo I** se recogen los experimentos y resultados correspondientes a los taxones de las Islas Baleares. Tomando como partida la filogeografía de *Podarcis lilfordi* (tesis doctoral Dra. Bàrbara Terrasa), especie endémica de las Islas Gimnesias, se inicia el estudio de la especie hermana, *Podarcis pityusensis* (endémica de Islas Pitiusas). En primer lugar se caracterizan una serie de marcadores microsatélite (Bloor *et al.* 2011) para ambas especies. Posteriormente, se determina la variabilidad genética e infiere la historia biogeográfica de la lagartija pitiusa, mediante la integración de estos datos nucleares con las secuencias identificadas en cinco fragmentos mitocondriales (Rodríguez *et al.* 2013).

El **Capítulo II** hace referencia al Archipiélago Maltés y la especie endémica de este territorio, *Podarcis filfolensis*. En este caso, se determina la filogeografía de la lagartija maltesa y se propone, al extraer la información contenida en un gen nuclear, un conjunto de 11 *loci* microsatélite y cinco fragmentos mitocondriales, una hipótesis con los procesos que podrían haber dado lugar a su distribución y estado actual (Rodríguez *et al.* 2014).

Por último, *Podarcis tiliguerta*, especie endémica de Córcega y Cerdeña, constituye el eje central del **Capítulo III**. La diversidad y distribución de la lagartija tirrena se analiza mediante marcadores mitocondriales. Los resultados obtenidos en esta investigación se completan en un mismo manuscrito con datos nucleares, obtenidos por otro de los co-autores.

--Acrónimos y Símbolos--

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
AMOVA	<i>Analysis of MOlecular VAriance</i>
AP	Antes del Presente
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ASTER*	<i>Advanced Spaceborne Thermal Emission and Reflection Radiometer</i>
c.	<i>circa</i> (alrededor, aproximadamente)
CIMO	Clado de Islas del Mediterráneo Occidental
CITES	Convenio sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
CNEA	Catálogo Nacional de Especies Amenazadas
cytb	citocromo b
dNTP	desoxirribonucleótido
ddNTP	desoxirribonucleótido marcado o terminador
ESA*	<i>European Space Agency</i>
ESS	<i>Effective Sample Size</i>
ESU	Unidad Evolutiva Significativa
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros, y colaboradores)
HPD	<i>Highest Posterior Density</i>
IUCN	<i>International Union for the Conservation of Nature</i>
Ka	miles de años
Ma	millones de años
MCMC	algoritmo Monte Carlo con Cadenas de Markov
MERIS*	<i>Medium Resolution Imaging Spectrometer</i>
MIS	<i>Marine Isotopic Stages</i>
MODIS*	<i>Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer</i>
MRCA	Antepasado Común Más Reciente
MSC	Crisis Salina Mesiniense
MU	Unidad de Manejo
NASA*	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
ND	fragmento NAD deshidrogenasa
nt	nucleótido/s
o/n	<i>over nighth</i> (toda la noche)
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
STR	<i>Short Tandem Repeat</i> o microsatélite
TMRCA	Tiempo desde el Antepasado Común Más Reciente
v.	versión

*Acrónimos utilizados exclusivamente en imágenes

**No se indican los símbolos para unidades de medida, éstos siguen la nomenclatura propia del Sistema Internacional de Medidas

ÍNDICE

Agradecimientos	
Presentación	i
Acrónimos y/o símbolos	iii
INTRODUCCIÓN	1
1. Cuenca Mediterránea	4
1.1 Archipiélagos.....	6
1.2 Historia geológica	8
2. El género <i>Podarcis</i>	13
2.1 <i>Podarcis lilfordi</i>	15
2.2 <i>Podarcis pityusensis</i>	16
2.3 <i>Podarcis filfolensis</i>	17
2.4 <i>Podarcis tiliguerta</i>	18
3. Marcadores Moleculares	20
3.1 ADN mitocondrial	21
3.2 Microsatélites	23
4. Aproximaciones analíticas.....	25
4.1 Filogeografía.....	25
4.2 Biología de la Conservación.....	33
OBJETIVOS.....	41
MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
1. Material de estudio.....	47
2. Análisis moleculares.....	48
2.1 Extracción ADN genómico.....	48
2.2 Cuantificación de ADN	49
2.3 Amplificación y secuenciación de genes	49
2.4 Diseño de microsatélites	52
2.5 Genotipado de microsatélites	55
3. Análisis de datos	56
3.1 Interpretación de secuencias y fragmentos.....	56

3.2 Diversidad genética	58
3.3 Test de neutralidad	58
3.4 Estructura poblacional	59
3.5 Modelos evolutivos	61
3.6 Filogenia y datación de linajes	61
3.7 Historia biogeográfica y demografía	64
RESULTADOS	67
Capítulo I: Islas Baleares.....	69
<i>Polymorphic microsatellite loci for the Balearic Island Lizard Podarcis lilfordi (Squamata: Lacertidae).....</i>	<i>70</i>
Análisis preliminar de 15 microsatélites en <i>Podarcis lilfordi</i>	76
<i>Multilocus genetic diversity and historical biogeography of the endemic wall lizard from Ibiza and Formentera, Podarcis pityusensis (Squamata: Lacertidae).....</i>	<i>78</i>
Análisis preliminar de poblaciones introducidas de <i>Podarcis pityusensis</i>	100
Capítulo II: Archipiélago Maltés; Filogeografía de Podarcis filfolensis.....	101
Capítulo III: Archipiélago Córcega-Cerdeña; Filogeografía de Podarcis tiliguerta	121
DISCUSIÓN GENERAL	147
CONCLUSIONES.....	171
REFERENCIAS	177
ANEXOS	201
Anexo 1. Subespecies de Podarcis pityusensis.....	203
Anexo 2. Subespecies de Podarcis tiliguerta.....	209
Anexo 3. Accesos GenBank	213
Anexo 4. Microsatélites de Podarcis spp.....	219

INTRODUCCIÓN

Históricamente las islas han atraído el interés de ecólogos, biogeógrafos y biólogos evolutivos, ya que son un modelo de estudio que permite investigar una versión simple de un mundo mucho más complejo (Grant 1998). El aislamiento, sus ciclos vitales e historia, las características geográficas o el tamaño reducido que presentan, así como la existencia de comunidades elementales o límites bien definidos, son rasgos esenciales que las convierten en museos vivientes o laboratorios naturales (Emerson 2002; Fernández-Palacios 2010). Además, en ellas, numerosos organismos con diversos orígenes han sufrido los mismos procesos evolutivos, bajo las mismas condiciones insulares, convirtiéndose así en réplicas del mecanismo evolutivo (Grant 1998), y pudiendo ser considerados experimentos naturales.

Las islas presentan un flujo génico limitado, lo que las convierte en una elección perfecta para estudiar la influencia del aislamiento geográfico en la diferenciación o diversificación (Grant 1998), considerándose unidades para probar procesos evolutivos (Mayr 1963; Emerson 2002). En principio, la falta de conexión terrestre con otros territorios debería anular el flujo génico, aunque se ha revelado, en algunos casos, la existencia de un cierto grado de migración, por ejemplo en la recolonización de islas en las Bahamas por lagartijas de islas vecinas, que llegan arrastradas por corrientes de agua, o en la dispersión transmarina a lo largo del Estrecho de Gibraltar de *Podarcis* sp (Schoener *et al.* 2001; Harris *et al.* 2002; Calsbeek & Smith 2003).

Las islas también constituyen sistemas dinámicos. Continuamente pueden recibir nuevos colonizadores que mueren o se adaptan, e incluso pueden desplazar a especies nativas (Schembri & Lanfranco 1996). Cuando un colonizador se adapta al nuevo entorno acumula características únicas, las oportunidades ecológicas conducen a una rápida diversificación. Ante un aislamiento geográfico prolongado, el colonizador evoluciona y diverge de manera diferente a los especímenes que permanecieron en su anterior área de distribución, ya que las nuevas opciones ecológicas le pueden conducir a una rápida diversificación, convirtiéndose en un taxón único con un rango de distribución limitado, es decir, un **endemismo**. De esta manera, el aislamiento físico y la heterogeneidad de hábitats convierten a las islas en escenario de estrategias de adaptación innovadoras, y en

repositorio de endemismos, riqueza de especies y ciertas peculiaridades genéticas (Deidun 2010).

Sin embargo, el potencial evolutivo de las especies insulares, especialmente si son endémicas, está comprometido; su alto grado de adaptación a la isla –especialistas de hábitat, dependen de recursos localizados y específicos– limita su habilidad para adaptarse genéticamente a cambios en el ambiente (Frankham 1997). Además, las islas no pueden ofrecer refugio durante cambios ecológicos, y sus poblaciones suelen estar limitadas en tamaño. Todos estos ingredientes convierten a los endemismos insulares en los más vulnerables frente a cambios en su entorno (Grill *et al.* 2007), confiriendo a su identificación y conservación máxima prioridad. Especialmente, al no tener homólogo en el continente y representar la más antigua y la más diferenciada población (Frankham 1997), dado que su desaparición conlleva a la extinción global de la especie.

El primer paso para conservar estos endemismos es identificar y mantener *hotspot* o puntos calientes de biodiversidad (Médail & Quézel 1999), que son áreas geográficas particularmente ricas en número de especies, niveles de endemismo y taxones raros o amenazados (Myers *et al.* 2000).

1. Cuenca Mediterránea

El Mediterráneo (Fig. 1), con una extensión de casi tres millones de kilómetros cuadrados, baña las costas de tres continentes: Europa, África y Asia, y alberga 11.879 islas e islotes (Arnold 2008), siendo la línea de costa continental sólo un 15% mayor que la longitud total de todas sus islas (Blondel *et al.* 2010). Como indica su nombre, el *Mar Medi Terraneum* (latín, mar entre tierras), está rodeado por tierra y sólo conecta con otras masas de agua por el estrecho de Gibraltar y el Canal de Suez. Esta configuración cerrada, así como su posición latitudinal, otorgan características propias a esta región, modula los procesos geológicos y permite que se preserven registros de fluctuaciones climáticas pasadas (Krijgsman 2002). Y, a su vez, la estructura de la cuenca, y los eventos geológicos acontecidos a lo largo de su historia, han impulsado la gran riqueza de especies existente,

y el alto índice de endemismos, lo que ha convertido a la región Mediterránea en uno de los 25 *Hotspots* de Biodiversidad (Myers *et al.* 2000; Cuttelod *et al.* 2008; Assunção-Albuquerque *et al.* 2012), confiriéndole un gran valor en la conservación de la biodiversidad mundial.

Se ha denominado el *Mare Nostrum* de las Ciencias de la Tierra, debido a que es uno de los laboratorios naturales más interesante en el mundo para el estudio de geodinámica y procesos paleoclimáticos a diferentes escalas (Krijgsman 2002). Pero esta designación puede ampliarse a otras disciplinas en las que también ha ocupado un papel protagonista, ya que es una de las regiones más complejas del planeta en términos de geología, historia, geografía, morfología, evolución, biodiversidad e historia natural (Blondel & Aronson 1999). Un reflejo de esto es que contiene archipiélagos que difieren en área, geología, aislamiento, antigüedad, ecología y ritmo de colonización humana (Bover *et al.* 2008). Todas las islas Mediterráneas se parecen unas a otras, y cada isla es diferente a su propia manera (Vogiatzakis *et al.* 2008).

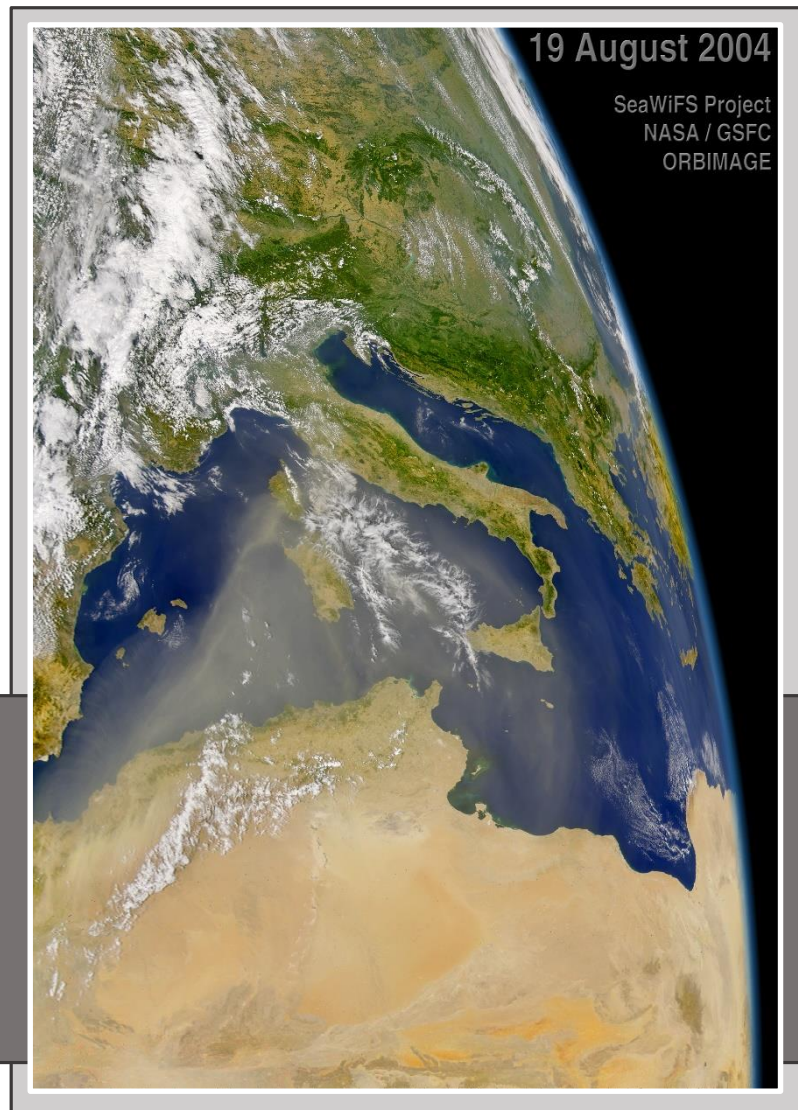


Figura 1. Cuenca Mediterránea. Imagen titulada *African Dust over the Mediterranean*, tomada el 19 de Agosto de 2004 por el sensor Sea-viewing Wide Field-of-view (SeaWiFS), a bordo del satélite OrbView-2. Imagen cortesía del Proyecto SeaWiFS, NASA/GSFC y ORBIMAGE. ©NASA

1.1 Archipiélagos

Al contrario que las islas oceánicas, las islas del Mediterráneo están situadas junto a tres continentes diferentes, con los que comparten similares factores físicos y biota. Cerdeña, Córcega, y algunas de las islas que configuran los archipiélagos Balear y Maltés, se encuentran entre las de mayor tamaño (Vogiatzakis *et al.* 2008).

Las **Islas Baleares** (Fig. 2A), situadas a *c.* 90 km de la Península Ibérica, conforman un archipiélago de 151 islas e islotes (+100 m de largo), cuatro de las cuales están habitadas y constituyen más del 99% de la superficie total: Mallorca, Menorca, Ibiza y Formentera (Mannion & Vogiatzakis 2007; Morey & Ruiz-Pérez 2008). Mallorca y Menorca, con sus respectivos islotes, forman las Islas Gimnesias e Ibiza y Formentera, las Islas Pitiusas.

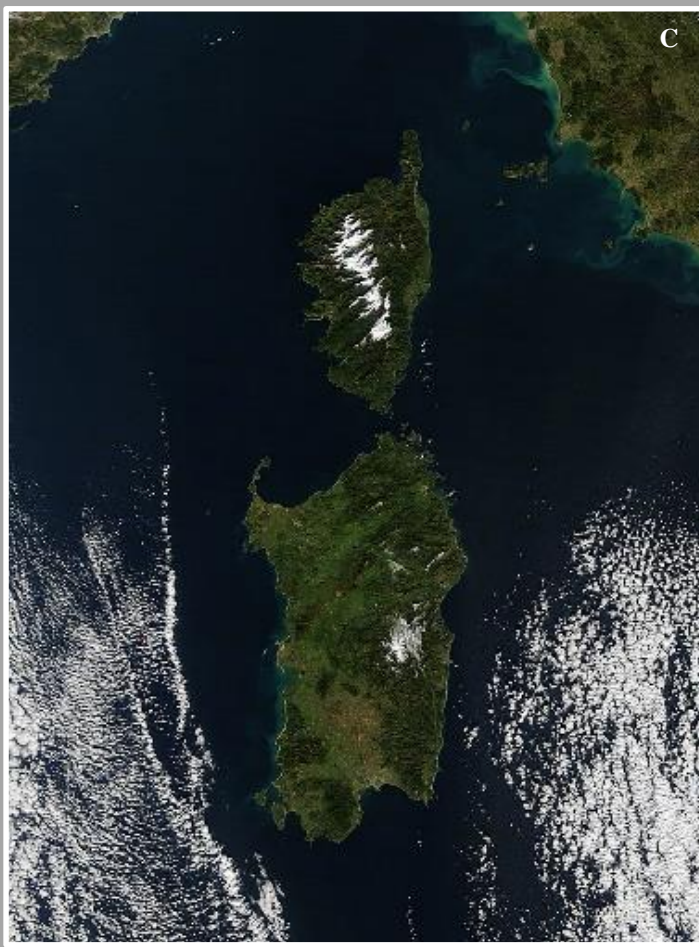
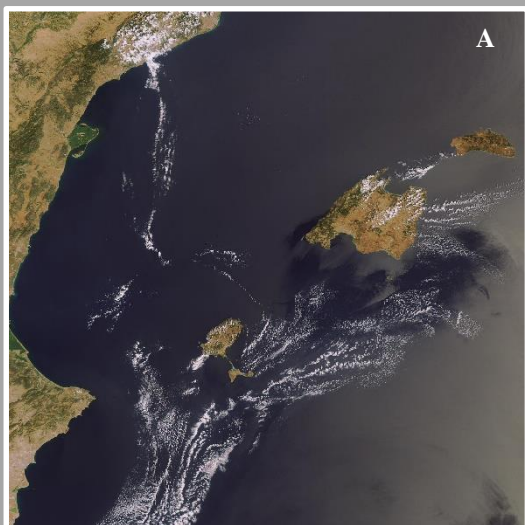
El **Archipiélago Maltés** (Fig. 2B) está localizado en el centro del Mediterráneo, a 96 Km de Sicilia y 290 Km del norte de África, y está formado por pequeñas islas relativamente planas. Malta, Gozo y Comino son las islas principales, y las únicas habitadas, mientras que el resto representan pequeños islotes despoblados (Cominotto, Filfla, St. Paul, Fungus Rock,...). Este archipiélago se caracteriza por presentar gran diversidad de ecosistemas y paisajes, y por la gran presión humana a la que se ha visto sometido en los últimos años. Malta no sólo está densamente poblada (1.080 habitantes por Km², siendo la media del Mediterráneo 111), sino que, además, su población se ve aumentada por un millón de turistas al año (Cassar *et al.* 2008; Deidun 2010). Según el Directorio de Islas (*Island Directory, United Nations Environment Program*), Malta es una de las islas cuyos recursos naturales están más en riesgo debido al impacto humano (Deidun 2010), este organismo la sitúa en el cuarto puesto (de 234 islas) debido a impacto humano (<http://islands.unep.ch/Tihi.htm>), y en el tercero, por la importancia de su conservación terrestre (<http://islands.unep.ch/Tici.htm>).

Las **Islas Pelágicas** (Italia) son un pequeño grupo de islas situado a 150 Km al suroeste de la isla de Sicilia y 140 Km al noreste de Túnez, que forman parte, junto con el Archipiélago Maltés, del territorio emergido del bloque Pelágico, compartiendo, por

tanto, la misma historia geológica y geográfica (Pedley *et al.* 1978; Cassar *et al.* 2008). Este archipiélago está formado por tres islas: Lampedusa, Lampione (pequeño islote situado a 17 Km de la costa occidental de Lampedusa) y Linosa.

Cerdeña (Italia) es la segunda mayor isla del Mediterráneo, y presenta una gran diversidad paisajística (montañas, colinas, mesetas, lagos y planos), con un medio ambiente preservado (Pungetti *et al.* 2008), mientras que **Córcega** (Francia), es la cuarta en tamaño, pero la isla más montañosa (calificada como “Montaña en el mar”), la segunda más alta, con varios picos por encima de 2.000 m (Mouillot *et al.* 2008) y la menos poblada (28–30 habitantes por Km²), con un 40% de su área designada como Parque Natural (Vogiatzakis *et al.* 2008). Córcega está situada a 90 Km de Italia, y 170 Km del sur de Francia, y Cerdeña a 187 Km de Italia, y 184 Km de Túnez. Ambas islas (Fig. 2C) están separadas entre sí por un canal de 10 km (de entre 40–70 m de

Figura 2. Archipiélagos del Mediterráneo. A) Islas Baleares. Imagen tomada el 1 de agosto de 2006, con MERIS por Envisat. ©ESA B) Archipiélago Maltés. Imagen tomada el 29 de julio de 2009, por ASTER. ©NASA C) Córcega y Cerdeña. Imagen tomada el 9 de diciembre de 2012 por MODIS. ©NASA



profundidad), el Estrecho de Bonifacio. Junto con Baleares, Córcega y Cerdeña constituyen uno de los *hotspots* más importantes dentro del Mediterráneo (Médail & Quézel 1997; Médail & Quézel 1999; Grill *et al.* 2007).

1.2 Historia geológica

Los cambios producidos en las placas tectónicas originan la rotura y disgregación del súper-continente Pangea (Mesozoico, 200 Ma AP), que agrupaba todo los territorios emergidos, en dos bloques continentales: Gondwana, que incluye los territorios del sur, y Laurasia, con los del norte. Gondwana y Laurasia empiezan a separarse, con la formación del Mar de Tetis entre ellos (precursor del Mediterráneo), a la vez que se dividen en bloques más pequeños (Blondel *et al.* 2010). La posterior convergencia de las placas africana y europea disminuye gradualmente el tamaño de Tetis, hasta quedar reducido a lo que ahora conocemos como el Mar Mediterráneo (Mannion 2008). Numerosos y complicados movimientos en la deriva de continentes, contribuyen a la formación de la intrincada geografía del Mediterráneo (Blondel & Aronson 1999), siendo la convergencia entre África y Europa la fuerza principal de modelaje (Advokaat *et al.* 2014) desde el Cretácico Posterior (Gueguen *et al.* 1998).

Dos episodios conforman principalmente la región occidental y central del Mediterráneo: la apertura de la Cuenca Algero-Provenzal (también denominada Cuenca Balear por algunos autores), acompañada por la rotación del bloque de Córcega-Cerdeña, y la apertura de la Cuenca Tirrena (Krijgsman 2002).

En el Oligoceno Superior, un nuevo movimiento de África respecto a Europa, causa la rotación de la Placa Ibérica, que incluye todavía las grandes islas del Mediterráneo Occidental anexionadas (Blondel & Aronson 1999; Blondel *et al.* 2010) en forma de terrazas (Rosenbaum *et al.* 2002). Estas zonas (Fig. 3) se disponen a modo de cinturón, en el centro del cual se sitúa el promontorio Balear (las zonas emergidas de éste se corresponden con las Islas Baleares), que es una prolongación de las Cordilleras Béticas (Morey & Ruiz-Pérez 2008) y El Rif (Bético-Rif, zona interna), situados al oeste,

delante las Cabilias, y al este, Calabria y el bloque de Córcega-Cerdeña, que permanece unido a los Pirineos (Rosenbaum *et al.* 2002).

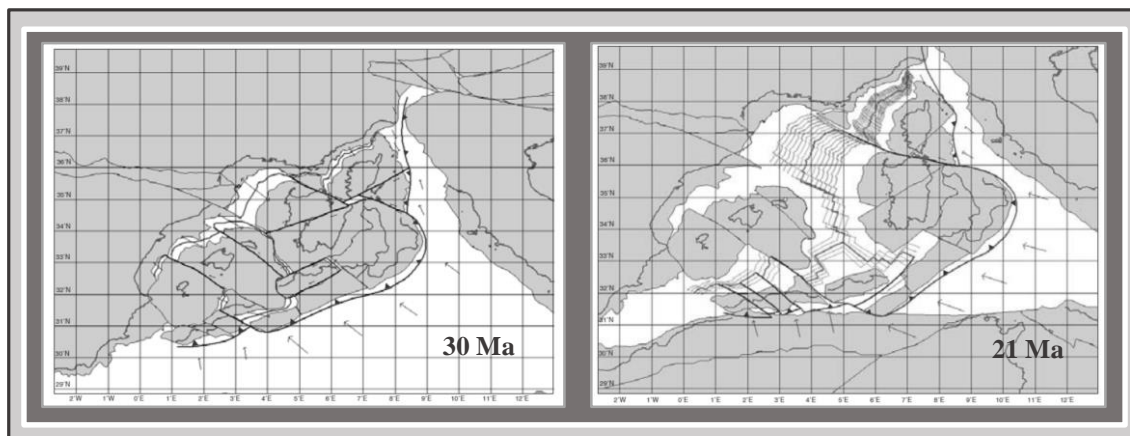


Figura 3. Reconstrucción de la formación de la Cuenca Mediterránea Occidental (Schettino & Turco 2006).

La microplaca de Córcega-Cerdeña inicia el despegue rotatorio (30–28 Ma AP) girando en sentido contrario a las agujas del reloj, respecto a Europa (Alvarez 1972, 1974; Rosenbaum *et al.* 2002; Meulenkamp & Sissingh 2003; Advokaat *et al.* 2014), mientras que el bloque que incluye las Baleares y la Gran Cabilia se desconecta, rotando en el sentido de las agujas de reloj, respecto a la península (Schettino & Turco 2006), Rida & Arderiu (1983) indican que son arrastrados por el movimiento del bloque corso-sardo (Fig. 3). El distanciamiento de estas microplacas del margen continental europeo-ibérico hacia el sur, o sureste, deja una estela de áreas de fina corteza continental (Depresión de Valencia), o pequeñas cuencas oceánicas (Cavazza & Wezel 2003), originando la apertura de las cuencas Balear (al norte de Cerdeña), Liguro-Provenzal (al norte de Córcega) y la Argelina, esta última al producirse la rotura y separación del bloque de la Gran Cabilia y el promontorio Balear (Schettino & Turco 2006). Al mismo tiempo, asociado a la formación de las cuencas, se produce la extensión del suelo marino (c. 28 Ma AP) (Rosenbaum *et al.* 2002; Schettino & Turco 2006). Progresivamente, las masas de tierra se desplazan hasta su posición actual (Blondel & Aronson 1999). Las Cabilias migran hacia el continente africano (Rosenbaum *et al.* 2002), hasta colisionar con él (c. 18–15 Ma AP), y adherirse a su margen, finalizando así la extensión de suelo marino (Schettino & Turco 2006). El bloque Bético-Rif, que durante su posicionamiento ha formado el Mar de Alborán, se anexiona en parte a la Península Ibérica y en parte al continente africano, engrosando la Cordillera Rif-Bética y constituyendo el Estrecho de Gibraltar (c. 10 Ma AP) (Rosenbaum *et al.* 2002). Al mismo tiempo, el bloque corso-sardo prosigue su

desplazamiento, manteniendo durante su recorrido la conexión con el continente (Meulenkamp & Sissingh 2003). Ésta se pierde con la finalización del movimiento rotatorio y la separación del bloque en la islas de Córcega y Cerdeña, hace *c.* 9 Ma (Alvarez 1972, 1974), momento en que se inicia la formación de la última cuenca, la Tirrena. Posteriormente, entre 7–5 Ma, como consecuencia nuevamente de la colisión de placas tectónicas, emerge la Plataforma Pelágica, una gran área localizada entre el Norte de África y Sicilia, de la que forman parte el Archipiélago Maltés y las Islas Pelágicas (Micallef *et al.* 2012).

Desde que se inicia la formación de la Cuenca Mediterránea, diferentes episodios modulan cambios tanto en el mar por sí mismo, como en los territorios que baña (continentales o islas). Sin embargo, el evento geológico más extremo acontecido, es la Crisis Salina Mesiniense (MSC, Fig. 4) (Selli 1954). Un cambio en la hidrología de la cuenca, inducido por una combinación de factores geodinámicos y climáticos, desencadena la desecación del Mediterráneo (Hsü *et al.* 1973a; 1973b) y su transformación en un desierto de sal gigante (Roveri *et al.* 2014). La entrada de agua desde el Océano Atlántico se va reduciendo drásticamente, hasta que cesa debido al cierre de la comunicación entre ambas masas de agua (5.96 Ma AP). Las consecuencias de este aislamiento hidrológico son una gran salinidad, y la desecación de la cuenca debido a la evaporación, lo que disminuye el nivel del mar alrededor de 1.5 km. El restablecimiento de la conexión con el océano supone el fin de la crisis (5.33 Ma AP) (Hsü *et al.* 1977; Krijgsman *et al.* 1999; Krijgsman 2002; Duggen *et al.* 2003; Rouchy & Caruso 2006; Mannion 2008; Garcia-Castellanos & Villasenor 2011). La reapertura de la conexión, por el Estrecho de Gibraltar, promueve la inundación de la cuenca en un periodo de tiempo muy corto, en un evento conocido como la Inundación Zancliense (Edad/Piso) (Garcia-Castellanos *et al.* 2009; Garcia-Castellanos & Villasenor 2011; Roveri *et al.* 2014). García-Castellanos *et al.* (2009) sugieren que el 90 por ciento del agua es transferida en un tiempo que oscila entre pocos meses y dos años, derivando en una finalización abrupta de la MSC.

La MSC es también una crisis ecológica, ya que, la desecación de la cuenca, desencadena una gran disminución de representantes de muchos *phylum*, sobretudo de aguas profundas (Emig & Geistdoerfer 2004). No obstante, a su vez, promueve la

biodiversidad. Este evento facilita el establecimiento de conexiones entre regiones que hasta entonces habían permanecido aisladas, permitiendo así, el trasiego de biota de un territorio a otro (Alcover 2000). Al final de ésta, con el rellenado de la cuenca, cesa el intercambio de biota y las poblaciones establecidas en nuevos territorios, durante la MSC, presentan una evolución independiente de sus antecesores, derivando en nuevos taxones.



Con la llegada del Cuaternario o Edad de Hielo, hace *c.* 2.6 Ma AP (Gibbard *et al.* 2010), el clima global cambia drásticamente y se inicia una sucesión de periodos glaciares e interglaciares (Hunt & Schembri 1999; Emig & Geistdoerfer 2004), posiblemente más de 30 ciclos climáticos (Mannion & Vogiatzakis 2007) con un intercambio rápido, disminuyendo o aumentando la temperatura media varios grados (7–15°C) en décadas (Hewitt 2001, 2004a). En este periodo no sólo es importante la temperatura oscilante y anormalmente baja, sino también el balance de agua y las fluctuaciones a nivel marino. Penck & Brückner (1909) establecen la relación entre clima y cambios en el nivel del mar, el cual cambia durante el Cuaternario como consecuencia de ciclos de crecimiento y declive de las capas de hielo, como resultado, a su vez, del almacenamiento del agua en casquetes de hielo continentales, y su fundición subsiguiente (Guilcher 1969), dando lugar a complejos patrones espaciales y temporales (Lambeck & Chappell 2001). El mecanismo glacio-eustático define el intercambio de agua entre las capas de hielo y los océanos de la siguiente forma: en el máximo glaciario, el hielo se extiende por los territorios, reduciendo el volumen de agua en océanos y mares, lo que conlleva la bajada del nivel del mar y la conexión de regiones cercanas; mientras que en la etapa interglaciaria, la disminución de zonas congeladas hace que suba el nivel del mar, y aísla de nuevo las masas de tierra. La formación de puentes entre islas o con el

continente (por ejemplo, conectando Cerdeña con Córcega, Ibiza y Formentera, Islas Maltesas y Sicilia) por la alteración de la línea de costa, permite una reordenación de flora y fauna (Mannion & Vogiatzakis 2007), es decir, cambia la distribución de los organismos (Hewitt 2004a). De esta forma, estos ciclos del Cuaternario modulan la estructura genética de las poblaciones y especies (Hewitt 1999; Hewitt 2000), imprimiendo su huella en ellos, de modo que todas las especies cargan con señales atenuadas de su pasado dinámico (Hewitt 2004a). A nivel global, en este periodo, algunas especies se extinguen de gran parte de su rango, otras se dispersan a nuevos territorios, otras sobreviven en refugios, para posteriormente expandirse; y todo esto, ocurre repetidamente (Hewitt 2000).

En el Holoceno (10 Ka AP), el periodo interglaciar actual, el factor modificador más importante o agente de cambio, es el *Homo sapiens* (Mannion & Vogiatzakis 2007). La llegada del hombre a las islas del Mediterráneo (Cerdeña hace 13.5 Ka; Córcega, 11.5–9.5 Ka; Baleares 8–4 Ka; Malta, 7.5 Ka; Vogiatzakis *et al.* 2008), no sólo inicia un proceso de cambio del paisaje, sino que también afecta a la distribución de los organismos al introducir nuevas especies en territorios en los que antes no habitaban, conduciendo en muchos casos a la extinción de especies nativas (Mannion & Vogiatzakis 2007). Actualmente, el hombre es la mayor amenaza para especies y ecosistemas, y esto se ve representado en el Mediterráneo, donde, según Blondel *et al.* (1999; 2010), la influencia de la humanidad es más fuerte que en cualquier otra parte del mundo. Esta perspectiva conduce a la designación de una nueva era geológica, el Antropoceno, donde el hombre es el mayor impulsor de procesos a escala global, desde cambios atmosféricos a extinciones bióticas (Crutzen 2002; Zalasiewicz *et al.* 2010), rivalizando con procesos ecológicos y geológicos naturales en la modificación de la biodiversidad actual (Ficetola & Padoa-Schioppa 2009).

La reconstrucción de la orogenia y geodinámica del Mediterráneo es un complejo puzzle (Gueguen *et al.* 1998), en este apartado se representa de forma simplificada algunos de los eventos más significativos de la historia paleogeográfica de la cuenca, la cual ha sido intrincada, afectando significativamente, no sólo a los territorios, sino también a su biota. Estos eventos y factores históricos característicos determinan la gran riqueza observada en la actualidad (Verlaque *et al.* 1997).

2. El género *Podarcis*

El género *Podarcis* (Wagler 1830) engloba un grupo de especies que en términos coloquiales se denominan lagartijas, aunque esta designación no es exclusiva, y se aplica a otros lacértidos de pequeño tamaño (por ejemplo, *Algyroides*, *Psammodromus* o *Zootoca*). La distribución de este género es *circum*-Mediterránea, y representa el grupo de reptiles predominante en el sur de Europa (Harris & Arnold 1999; Arnold *et al.* 2007). Es un género monofilético incluido dentro de la familia *Lacertidae* (Oppel 1811; Orden *Squamata*), cuya historia evolutiva se remonta hasta el Cretácico Inferior (139.3 Ma AP), tras la rotura del supercontinente Pangea (Hedges & Vidal 2009), aunque el origen de *Podarcis* es más reciente, se estima hace unos 20–18 Ma (Pérez-Mellado 2009). La radiación adaptativa que origina los grupos de lacértidos actuales, su distribución y diversificación en un tiempo evolutivo muy corto, convierten a este grupo en un buen marcador evolutivo (Oliverio *et al.* 2000). En particular, *Podarcis*, como organismo modelo, es el protagonista de multitud de estudios a nivel ecológico y genético (por ejemplo, Capula 1996, Oliverio *et al.* 2000, Harris *et al.* 2000, Podnar & Mayer 2005, Vervust *et al.* 2007, Hurston *et al.* 2009, Camargo *et al.* 2010, Buades *et al.* 2013, Garrido *et al.* 2014, Pérez-Mellado *et al.* 2014).

Los miembros de este género comparten numerosas similitudes de tipo bioquímico, ecológico, biogeográfico y morfológico (al menos 11 caracteres derivados), además de su versatilidad. *Podarcis* es muy variable morfológicamente, en coloración, forma y número de escamas (Guillaume & Cirer 1985; Pérez-Mellado 1998; Harris & Arnold 1999; Arnold & Ovenden 2002; Bruschi *et al.* 2006; Carretero 2008; Fulgione *et al.* 2008; Pérez-Mellado *et al.* 2008a; Pérez-Mellado 2009; Kaliontzopoulou 2010; Piras *et al.* 2011; Schulte *et al.* 2011; Salvi *et al.* 2013), a nivel interespecífico, intraespecífico e intrapoblacional, dificultando su clasificación. Estos rasgos discontinuos han hecho que la taxonomía del género sea controvertida y esté en revisión continua: 17 especies fueron reconocidas por Böhme (1986), Harris & Arnold (1999) o Oliverio *et al.* (2000), 21 por Speybroeck *et al.* (2010), y entre 18–23 según la base de datos consultada:



Figura 5. Especímenes del género *Podarcis*. *P. lilfordi*, en Cabrera (A, B), *P. pityusensis* (C, D), *P. filfolensis*, en Far Gordan, en la isla de Gozo (E) y en Comino (F), *P. tiliguerta*, de la isla de Córcega (G, H) y *P. sicula*, en Cerdeña (I). Fotos: Jordi Serapio (C, D), Peter Oefinger (G), Bàrbara Terrasa (E, F, H, I) y Virginia Rodríguez (A, B).

18, *Fauna Europaea* (de Jong 2013); 21, según la *Taxonomy Database* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI); y 23 según *The reptile database* (Uetz & Hosek 2014). Sin embargo, al comparar todas las listas, el recuento asciende a 24 especies. A nivel intraespecífico esta variabilidad también se traduce en un gran número de subespecies, por lo que algunos autores recomiendan una re-evaluación taxonómica (Oliverio *et al.* 1998; Oliverio *et al.* 2000).

Diecinueve especies están representadas en islas del Mediterráneo, de las cuales diez son endémicas (*P. gaigae*, *P. milensis*, *P. raffonei*, *P. wagleriana*, *P. cretensis*, *P. levendis*, *P. lilfordi*, *P. pityusensis*, *P. filfolensis* y *P. tiliguerta*) es decir, presentes exclusivamente en estas islas, el resto son especies continentales que también están presentes en islas (*P. liolepis*, *P. muralis*, *P. sicula*, *P. erhardii*, –complejo de– *P. hispanica*, *P. taurica*, *P. melisellensis*, *P. vaucheri* y *P. peloponnesiaca*).

La presente tesis versa sobre cuatro de estas especies endémicas e insulares, próximas genéticamente y componentes del Clado de Islas del Mediterráneo Occidental (CIMO) (Arnold *et al.* 2007): *Podarcis lilfordi*, *Podarcis pityusensis*, *Podarcis filfolensis* y *Podarcis tiliguerta*.

2.1 Lagartija balear - *Podarcis lilfordi* (Günther 1874)

La especie balear (Fig. 5), es una lagartija de constitución robusta (longitud máxima cabeza-cuerpo en machos 81 mm, y en hembras 75 mm), cabeza alta, cuello ancho y hocico relativamente aguzado, con presencia del pliegue gular y coloración que va desde el verde grisáceo hasta el negro uniforme, con un diseño más o menos visible de líneas longitudinales dorsolaterales, siendo el tamaño corporal y el patrón de coloración variable en función de la población microinsular a la que pertenece (Pérez-Mellado 1998).

Esta especie es endémica de las Islas Gimnesias, aunque actualmente no está presente en las islas principales de Mallorca y Menorca (Terrasa *et al.* 2009), sólo en sus islotes costeros con una extensión y cobertura vegetal suficiente para permitir su

presencia. La introducción de depredadores por parte del hombre (martas, jinetas, comadreas o carnívoros domésticos) es señalada como la responsable de la desaparición de *Podarcis lilfordi* de Mallorca y Menorca (Kotsakis 1981; Corti *et al.* 1999; Salvador 2006a; Pérez-Mellado 2009), que, según el registro fósil, ocurrió hace *c.* 2 Ka. Se han identificado 25 subespecies, correspondientes a las 42 localizaciones reconocidas, distribuidas en 10 de los 40 islotes de Mallorca, 16 de los 29 de Menorca y el archipiélago de Cabrera (Pérez-Mellado 2009).

P. lilfordi está clasificada como especie “en peligro” (EN), siguiendo los criterios de la *International Union for the Conservation of the Nature* (IUCN), en el Libro Rojo de Especies Amenazadas, tanto en la lista mundial (EN B1 ab(iii)+2ab(iii))(Pérez-Mellado & Martínez-Solano 2009a), como en la nacional (EN B1+2bd)(Pérez-Mellado 2002a), y como especie vulnerable (VU D2), en la balear (Viada Sauleda 2005). Se establece esta categoría debido a la fragmentación severa de las poblaciones (criterio B1) y el declive continuo del área de ocupación y de la calidad del hábitat (criterio 2bd). La categoría de protección asignada a esta especie en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (CNEA; Real Decreto 439/1990) es de interés especial (VER/66), también está incluida en el Anexo II de la Convención de Berna, relativo a la Conservación de la Vida Silvestre y el Medio Natural en Europa, en el Apéndice II del Convenio sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestres (CITES) y en los anexos II y IV de la Directiva 92/43/CEE, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres (Viada Sauleda 2005; Salvador 2006a).

2.2 Lagartija pitiusa - *Podarcis pityusensis* (Boscà 1883)

La lagartija de las Pitiusas (Fig. 5) es robusta (longitud cabeza-cuerpo, 93 mm en machos y 81 mm en hembras), de cabeza alta y hocico redondeado, de coloración dorsal verdosa o verde-pardusca con diseño en bandas dorsolaterales más o menos marcado (Pérez-Mellado 1998). La gran variabilidad intraespecífica que presenta el género, también se muestra en esta especie (Salvador 1984), encontrando especímenes variables tanto en robustez, como en color (sin diseño, parduscas o melánicas), lo que ha llevado a la descripción de hasta 45 subespecies. Revisiones posteriores reducen el número, aunque

no coinciden en el dígito: 6 (Cirer 1982, 1987) o 23 subespecies (Salvador 1984), siendo este último valor, el más aceptado (Pérez-Mellado 1998; Pérez-Mellado 2009). Las subespecies reconocidas, su descripción, distribución y categoría de amenaza individual (Salvador 1984, 2006b) están indicadas en el Anexo 1.

Esta especie es endémica de las Islas Pitiusas, habita en Ibiza, Formentera y 42 islotes circundantes, aunque también se han hallado poblaciones introducidas en algunas localidades de Mallorca (Ses Illetes, Cala Rajada o la antigua muralla de Palma), Barcelona (Plaza de las Glorias) y Vizcaya (Sant Juan de Gaztelugatxe) (Pérez-Mellado 1998; Pérez-Mellado 2009), evidenciando su habilidad colonizadora.

En cuanto al estatus de conservación, está catalogada como “casi amenazada” (NT) en las listas balear (Viada Sauleda 2005), nacional (Pérez-Mellado 2002b) y mundial (Pérez-Mellado & Martínez-Solano 2009b); las poblaciones insulares deben ser conservadas para que los procesos naturales continúen desarrollándose sin interferencia (Salvador 2006b). Además, al igual que su especie hermana, está incluida en los Anexos II y IV de la Directiva Europea de Hábitats, donde se considera que deben designarse zonas especiales para su protección estricta, en el Anexo II de la Convención de Berna, en el Apéndice II del CITES y la CNEA la cataloga como especie de interés especial (VER/67) (Viada Sauleda 2005; Salvador 2006b). También ha sido catalogada en la Orden 20.287/1990 del Gobierno Balear en su Anexo II, como especie de interés especial (Pérez-Mellado 1998). Las poblaciones de las islas principales están en buen estado de conservación, el problema aparece en las islas más pequeñas e islotes con poca cobertura vegetal, presentando algunos de ellos poblaciones en declive. Por eso, a pesar de que la especie sea designada como casi amenazada, algunas subespecies presentan criterios que las catalogan como en peligro de extinción (Anexo 1).

2.3 Lagartija maltesa - *Podarcis filfolensis* (Bedriaga 1876)

La lagartija maltesa (Fig. 5) es de talla media (longitud cabeza-cuerpo de 61 mm en los machos, y 58 mm en las hembras), con cabeza relativamente aplastada y coloración dorsal muy variable, pero en general dominan las tonalidades pardas o grisáceas, con

pigmentación de manchas negruzcas alineadas en zonas dorsolaterales y vertebrales; la zona ventral es también muy variable, con fondos blancuzcos, amarillentos o naranjas y pigmentación de manchas negruzcas más o menos extendidas (Arnold & Ovenden 2002; Lo Cascio *et al.* 2011).

Podarcis filfolensis (Bedriaga 1876) es endémica del archipiélago Maltés (Lanfranco 1955; Lanza 1973; Corti & Lo Cascio 1999) y presenta 5 subespecies: *P. f. maltensis* en Malta, Gozo y Comino; *P. f. kieselbachi* en la isla de St. Paul (Sciberras & Schembri 2008); *P. f. filfolensis* en la isla de Filfla; *P. f. generalensis* en Fungus Rock y *P. f. laurentiimuelleri* en dos de las Islas Pelágicas, Linosa y Lampione (Capula 1994; Corti & Lo Cascio 1999; Scalera *et al.* 2004; Corti *et al.* 2009a). La presencia de esta especie en las Islas Pelágicas se debe probablemente a dispersión antropogénica (Capula 1994). En principio, las subespecies se diferencian en el tamaño medio del cuerpo y la coloración (Lanfranco 1955; Lanza 1972), sin embargo no se aprecian diferencias morfológicas entre algunas de ellas, pudiendo ser identificadas sólo por su procedencia (Sciberras & Schembri 2008).

La Lista Roja de Especies Amenazadas mundial la clasifica como de “preocupación menor” (LC), sin embargo, está incluida en el Anexo II del Convenio de Berna (Especies de Fauna estrictamente protegidas) y en el Anexo IV de la Directiva de Hábitats (Especie de interés para la comunidad, necesidad de protección estricta) (Sciberras & Schembri 2008; Corti *et al.* 2009a).

2.4 Lagartija tirrena - *Podarcis tiliguerta* (Gmelin 1789)

La lagartija tirrena (Fig. 5) se caracteriza por tener una talla media o pequeña (longitud cabeza-cuerpo en machos de unos 56 mm, y en hembras de 53 mm), con cabeza ligeramente puntiaguda, corta y poco deprimida; cuerpo muy ligeramente deprimido y cola cilíndrica; en general, posee alguna pigmentación oscura ventral, especialmente en la región gular y coloración dorsal de fondo parda más o menos oscura, con tonalidades y manchas verdosas o negruzcas, dominando las tonalidades pardas en

su conjunto; los machos poseen en general manchas negruzcas alineadas en las áreas dorsolaterales, mientras que las hembras poseen líneas dorsolaterales nítidas (Arnold & Ovenden 2002; Bruschi *et al.* 2011).

P. tiliguerta es endémica de Córcega, Cerdeña e islas circundantes (Bruschi *et al.* 2006; Vasconcelos *et al.* 2006). Y, como el resto de especies, exhibe una gran variabilidad intraespecífica, especialmente respecto al patrón de coloración y melanismo (Lanza 1972; Lanza & Brizzi 1974; Brizzi & Lanza 1975; Lanza 1976; Lanza & Brizzi 1977; Lanza & Poggesi 1986; Arnold & Ovenden 2002). Esta diversidad deriva en que poblaciones de diferentes islas satélites se designen como subespecies diferentes (diez en total), mientras que una única subespecie, *P. t. tiliguerta*, es propia del resto del área de distribución (Bruschi *et al.* 2006; Bruschi *et al.* 2011; Lescure & Massary 2012; Uetz & Hosek 2014). En el Anexo 2, se indican las subespecies de *P. tiliguerta* y su distribución.

Al igual que la maltesa, la lagartija tirrena está clasificada como de “preocupación menor” (LC) en la Lista Roja de Especies Amenazadas mundial, y está incluida en el Anexo II del Convenio de Berna y en el Anexo IV de la Directiva de Hábitats, asimismo está protegida por la legislación nacional de Francia e Italia (Cheylan *et al.* 2009).

Por último, es importante resaltar a otro miembro del género, *Podarcis sicula*. La lagartija italiana es una especie con gran capacidad colonizadora, que se encuentra presente en algunas de las islas estudiadas en esta tesis (Menorca, Lampedusa, Córcega y Cerdeña). Aunque su territorio natural es la Península de Italia y Sicilia, su distribución se extiende a otros territorios Mediterráneos, como la Costa Adriática, Córcega o Cerdeña, e incluso a EEUU (Podnar *et al.* 2005; Salvador 2006c). En la bibliografía se documenta que esta especie compite con *Podarcis tiliguerta* en Córcega y Cerdeña (Corti *et al.* 1999; Mangiacotti *et al.* 2011). La introducción de una especie fuera de su rango natural, como en este caso la lagartija italiana, puede derivar en dos posibles escenarios: co-habitar en simpatria con especies locales, e incluso hibridar, causando imperceptibles cambios en la biodiversidad (Blondel *et al.* 2010), o desplazar a la especie nativa, provocando un declive en la diversidad global. Se han registrado casos en los que tras la colonización, *P. sicula* ha desplazado a la especie autóctona: *P. tiliguerta*, en Córcega; *P.*

melissellensis, en algunos islotes de la Costa Dálmata (Podnar *et al.* 2005); *P. lilfordi*, en islas adyacentes a Menorca (Cheylan & Poitevin 1994) o *P. raffonei*, en las Islas Eolias, en este último ejemplo la especie nativa está próxima a la extinción (Capula 1993; Corti *et al.* 2009b).

3. Marcadores moleculares

Los organismos contienen una crónica imborrable de su pasado evolutivo impregnada en el material genético, dado que los principales eventos demográficos han dejado una huella en su genoma, la cual es transmitida a las generaciones sucesivas (Jorde *et al.* 1998). Actualmente, esta información contenida en el ADN puede ser extraída a través del análisis de marcadores moleculares, y descifrada por una combinación de herramientas moleculares y algoritmos estadísticos. Los marcadores moleculares permiten describir patrones genéticos en las poblaciones naturales a escalas que van desde individuos a especies, y a partir de estos patrones, aplicando la teoría evolutiva y de genética de poblaciones, se puede inferir los procesos demográficos y evolutivos que han actuado sobre la especie a distintas profundidades temporales (Godoy 2009). Por tanto, la genética nos proporciona herramientas para entender cómo se han visto afectados los organismos por los cambios en su territorio a lo largo del tiempo (Hewitt 2000), y también para la identificación de especies y asignación de individuos a poblaciones.

Actualmente, el abanico de posibilidades es extenso, se dispone de multitud de herramientas, y una buena elección es esencial. Cada marcador tiene unas características propias, así como un patrón evolutivo diferente, en consecuencia, la selección de uno u otro viene determinado en función de los fines del trabajo; siendo el ADN mitocondrial –análisis de secuencias– y los microsatélites –análisis de fragmentos– los marcadores elegidos preferentemente. En general, el ADN mitocondrial (ADNmt) es un marcador indicado para el estudio de relaciones evolutivas y biodiversidad, mientras que los microsatélites son apropiados, además de para la estima de la diversidad genética, para la

inferencia de estructura y dinámica de poblaciones (Zhang & Hewitt 2003; Arif & Khan 2009).

3.1 ADN Mitocondrial

Awise *et al.* (1987) indicaron cuales debían ser las propiedades ideales para un marcador en análisis filogenéticos, y comprobaron que el ADN mitocondrial cumplía estos criterios. Las características que lo convierten en un marcador idóneo son la herencia matrilineal (Hutchison III *et al.* 1974; Giles *et al.* 1980), la homoplasmia (existe un haplotipo preponderante por cada individuo), que la mayoría de variantes resultan de cambios nucleotídicos (y pocas por cambios en la longitud de la molécula), que no recombina, su alta tasa de mutación, su neutralidad putativa y su pequeño tamaño poblacional efectivo (Awise & Lansman 1983; Brown 1983, 1985; Wilson *et al.* 1985; Hickerson *et al.* 2010). Esto es porque cuanto menor es el tamaño efectivo, menos tiempo pasará hasta que todos los alelos compartan un mismo ancestro y las filogenias se resolverán más rápidamente (Ballard & Whitlock 2004); la tasa evolutiva del ADN mitocondrial es diez veces mayor que en el ADN nuclear (Brown *et al.* 1979), lo que se traduce en un tiempo de coalescencia más corto, y una mejor reconstrucción de la filogenia de especies cercanas y, por último, la recombinación dificulta la identificación de las verdaderas genealogías, motivo por el que el uso de un marcador mitocondrial es mayoritario en trabajos filogeográficos.

Ciertos atributos, característicos del ADNmt, pueden representar a la vez ventajas e inconvenientes. La herencia uniparental y la no recombinación que nos permite identificar claramente genealogías, determina que las relaciones puedan estar representadas erradamente, pues sólo infiere una fracción, no la historia evolutiva completa (Ballard & Whitlock 2004). Esto queda expresado claramente en la afirmación de Wainscoat, “*We inherit our mitochondrial DNA from just one of our sixteen great-great grandparents, yet this maternal ancestor has only contributes one-sixteenth of our nuclear DNA*” (Wainscoat 1987). Aunque una genealogía obtenida a partir de un *locus* particular es solo una posibilidad al azar de las muchas genealogías posibles, otorga una imagen aproximada del marco evolutivo. Además, Awise (2009) manifiesta que hay

fragmentos con tasa de evolución rápida y lenta mejora los resultados respecto a análisis con fragmentos de una misma tasa evolutiva (Edwards 2009).

3.2 Microsatélites

Los microsatélites o STRs (*short tandem repeats*) (Miesfeld *et al.* 1981; Hamada *et al.* 1982; Sun *et al.* 1984) son secuencias de ADN, de 1 a 6 pb, que se repiten en tándem. Los alelos de este marcador difieren en el número de repeticiones de la secuencia, es decir por longitud, pudiendo presentar, cada *locus*, entre 5–100 repeticiones. El número de repeticiones es heredado y variable entre individuos. El modelo más aceptado para explicar el mecanismo evolutivo de los STRs es un error durante la replicación del ADN: el deslizamiento (*slippage*) de la ADN polimerasa, y su posterior emparejamiento incorrecto con la hebra de ADN, conducen, si no es reconocido y reparado por el sistema de corrección de errores, a un cambio en la longitud de la hebra naciente, por ganancia o pérdida de un *repeat* (Smith 1976; Tautz & Renz 1984; Stephan 1989; Schlötterer & Tautz 1992).

Su importancia como marcador genético radica en que son altamente polimórficos, neutros, codominantes y de herencia mendeliana, además, están distribuidos por todo el genoma (Tautz 1989; Weber & May 1989; Queller *et al.* 1993; Tautz 1993; Jarne & Lagoda 1996). Su tasa de mutación es elevada, lo que le hace idóneo para estudios intraespecíficos o de especies muy relacionadas, se estima entre 10^{-2} y 10^{-5} (Weber & Wong 1993), frente a una tasa de 10^{-9} por *locus* por generación para ADN de copia única (Li 1997). Esta evolución más rápida le convierte en una herramienta eficaz para inferir la demografía o los patrones de conectividad actuales, detectando cambios en el pasado más reciente (10–100 generaciones) (Jorde *et al.* 1998).

Otras particularidades que exhiben los STRs y le otorgan popularidad como marcador molecular, son: que se genotipan rápidamente por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa); que pueden amplificar ADN degradado, pues la región repetitiva no suele ser muy extensa; que son especie específicos, disminuyendo la probabilidad de una contaminación cruzada, y que presentan un elevado contenido informativo, diferentes

regiones del genoma pueden presentar historias genealógicas ligeramente diferentes debido a la recombinación, selección y deriva genética, por lo que al combinar diferentes regiones o *loci* –análisis multilocus– el resultado será más preciso (Chistiakov *et al.* 2006; Selkoe & Toonen 2006). La ventaja principal que presenta respecto al ADN mitocondrial, es que es un marcador de ADN nuclear, por lo que puede trazar la historia conjunta de ambos parentales.

Sin embargo, el análisis de este marcador también presenta inconvenientes: como los alelos nulos o la homoplasia. Mutaciones en las zonas flanqueantes del STR, concretamente en la secuencia complementaria al *primer*, pueden provocar que éste no se una y falle la amplificación, perdiéndose o reduciéndose el producto de PCR. Como los alelos no pueden ser visualizados, este problema recibe el nombre de alelos nulos (Callen *et al.* 1993). Cuando uno de los alelos falla, la consecuencia directa es un déficit de heterocigotos por un error en la detección. En principio, se asume que los alelos se diferencian por tamaño, por lo que fragmentos con la misma longitud son asignados al mismo alelo, sin tener en cuenta que pueden aparecer cambios en la secuencia que conlleven a que, aun cuando presenten la misma longitud, no son el mismo alelo (Sanderson & Hufford 1996; Estoup *et al.* 2002); de esta forma se enmascara y, por ende, subestima la diversidad alélica, a la vez que el flujo génico es sobreestimado (Garza & Freimer 1996). Además de esta homoplasia detectable, existe otra indetectable cuando los alelos son iguales en tamaño y secuencia, pero no son idénticos por descendencia (Jarne & Lagoda 1996; Selkoe & Toonen 2006). La existencia de estos fenómenos puede dar lugar a genealogías erróneas, por este motivo, según Garza y Freimer (1996), es necesaria la precaución en el uso de este marcador cuando el tiempo evolutivo es extenso; pueden emplearse para resolver relaciones dentro de una especie, pero no entre especies o géneros. A su vez, algunos autores indican que hay que limitar su uso en la identificación de unidades de conservación, sin embargo, tras una valoración de sus consecuencias, Estoup *et al.* (2002) concluyen que la gran cantidad de variabilidad presente en *loci* microsatélite compensa la presencia de homoplasia, y ésta no representa problemas para la mayoría de los análisis de genética de poblaciones.

La aplicabilidad de este marcador es extensa, se ha descrito su uso en diferentes terrenos: la identificación individual y asignación de parentesco, la inferencia de

filogenias a nivel de especie, la detección de la estructura o dinámica poblacional (diversidad genética, cuellos de botella, hibridación, tamaño poblacional efectivo, expansiones, fluctuaciones de tamaño, migración,..) y la identificación de unidades de conservación, especialmente MUs y AUs (Goldstein *et al.* 1999; Wan *et al.* 2004; Chistiakov *et al.* 2006), algunas de ellas englobadas dentro de esta tesis.

4. Aproximaciones analíticas

Dos disciplinas cobran especial relevancia en el marco de esta tesis: la filogeografía y la biología de la conservación. Aunque el objetivo de cada una es diferente, comparten metodología y están interrelacionadas entre sí, además, la filogeografía es una de las disciplinas más integrativas en biología. Al estudiar la correspondencia entre filogenia y geografía, se desprende que la filogeografía infiere la historia de las poblaciones, lo que permite evaluar el potencial evolutivo de las especies, convirtiéndose en una herramienta importante en el campo de la biología de la conservación, donde se utiliza para evaluar riesgos, asignar prioridades, delimitar unidades y diseñar estrategias de conservación eficaces (Godoy 2009).

4.1 Filogeografía

Concepto: Integración de Filogenia y Biogeografía

Aunque anteriormente se había avanzado la idea de solapar árboles filogenéticos en mapas geográficos para ayudar a determinar conexiones entre áreas, y la dirección del movimiento dentro de linajes (Brundin 1966; Hennig 1966), es en 1987, cuando Avise acuña el término filogeografía, para designar las interrelaciones filogenéticas con la distribución geográfica de los grupos filogenéticos (Avise *et al.* 1987; Avise 2009). Tras la observación de que las ramas de árboles de genes intraespecíficos muestran un patrón

geográfico, se establece que existe una relación entre genealogía y geografía. Se define, por tanto, la filogeografía como el análisis espacial –y temporal– de los linajes genéticos, especialmente dentro o entre especies muy relacionadas, englobando así, filogenia, genética de poblaciones y biogeografía en un mismo enfoque (Avice *et al.* 1987; Avice 2009).

La filogeografía de una especie infiere la historia de las poblaciones en el territorio estudiado: aparición de la especie, rutas de colonización a través de los territorios, diferenciación y evolución hasta el momento actual (Blondel *et al.* 2010), para así identificar las fuerzas históricas y contemporáneas que han producido la arquitectura genealógica actual (Avice 2009). Dentro de ésta, la filogeografía comparada permite, al contrastar los patrones filogeográficos de especies distribuidas en el mismo territorio, dado que estructuras filogeográficas similares pueden interpretarse como una historia evolutiva compartida, plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de vicarianza o dispersión, e identificar las causas geológicas, ecológicas y etológicas que pudieran haber influido en ellos (Platnick & Nelson 1978; Morrone & Crisci 1995; Bermingham & Moritz 1998).

En general, la mayoría de especies exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la geografía, estudiando conjuntamente genealogías y eventos geológicos y geográficos es posible detectar esta estructura filogeográfica, y tratar de interpretar la extensión y el modo en que los procesos demográficos históricos han dejado marcas evolutivas en la distribución geográfica actual.

Herramientas:
Árboles de genes-Árboles de especies
Teoría de Coalescencia
Reloj Molecular
Teoría Neutral

Los análisis filogeográficos se basan en el estudio de frecuencias alélicas, que devienen en frecuencias haplotípicas en el caso del ADNmt. Debido al rápido ritmo evolutivo del ADNmt, diferentes haplotipos coexisten dentro de las especies, y se puede trazar la trayectoria de todos ellos hacia atrás en el tiempo, hasta que en algún punto de la historia se encuentra un antepasado común a todos ellos (coalescencia); el diagrama de ramificaciones que conecta los haplotipos actuales con los ancestrales es un **árbol de**

genes o genealogía (Avice 2009). De esta forma, se evalúan los polimorfismos únicos y se define, utilizando los principios de coalescencia, una filogenia o árbol filogenético que representa la historia de las poblaciones o especies, y muestra la evolución de linajes a través del tiempo en forma de patrones de ramificación (Edwards 2009). La inferencia de la filogenia es el primer paso para comprender los patrones evolutivos de una región, ya que puede ayudar a entender el origen de la diversidad de los organismos, e identificar los mecanismos que han conducido a la riqueza de especies existente; son la base para mapear la evolución de caracteres morfológicos, ecológicos y de comportamiento (Hewitt 2001). A su vez, al integrar filogenia y antecedentes geológicos se puede vislumbrar la secuencia de colonización (Grant 1998).

La red de haplotipos es otro método de aproximación gráfica, en el que se describen las relaciones intraespecíficas en una red de modo reticulado –no jerárquico, ni evolutivo como en el árbol de genes– que especifica la frecuencia de los haplotipos, la asociación entre ellos al visualizar los pasos mutacionales que los separan, al mismo tiempo que se infieren los haplotipos faltantes. Además de los métodos gráficos, la filogeografía recurre a estadísticos tradicionales –por ejemplo, el test de neutralidad de la D de Tajima, análisis de varianza o distribución *mismatch*– también denominados de resumen.

Las mutaciones se acumulan a través del tiempo en las secuencias, una herramienta universal para transformar estas diferencias observadas en los datos moleculares a lenguaje evolutivo, incorporando el *tempo*, es el **Reloj Molecular**, que se fundamenta en la asociación entre divergencia de secuencia y divergencia de tiempo. De forma más precisa, el número de diferencias nucleotídicas al comparar secuencias homólogas es un estimador del tiempo de divergencia de estas secuencias, de modo que pueden utilizarse diferencias genéticas para medir el tiempo desde la separación evolutiva. Zuckerkandl & Pauling (1965) reportan este concepto fundamental –*The molecular evolutionary clock is not a “metronomic” clock; rather, it “ticks” are stochastic events*– tras apreciar, en diversas especies, una acumulación de diferencias moleculares en la hemoglobina correlacionada con el tiempo de separación de los taxones, es decir observan una tasa de evolución, que es constante en el tiempo y en todos los linajes. El descubrimiento de esta tasa relativamente constante de evolución, permite el

desarrollo de una de las herramientas más usadas en biología, no sólo para ubicar en el tiempo eventos evolutivos pasados, sino también para explorar y descifrar los mecanismos y procesos de la evolución (Bromham & Penny 2003).

Para aplicar el concepto de reloj molecular, y usar distancias genéticas para estimar tiempo de divergencia, es necesario una calibración que indique la cantidad de cambio genético esperado por unidad de tiempo evolutivo. La calibración del reloj molecular se realiza al medir las diferencias genéticas entre poblaciones o especies que han sido separadas por un lapso de tiempo conocido (Jorde *et al.* 1998), extrapolando este dato de tiempo a partir de eventos geológicos o registro fósil. De esta forma, al dividir la divergencia de las secuencias por el tiempo transcurrido, se obtiene la tasa de evolución molecular, expresada en sustituciones por sitio y por millón de años. Ante el uso del reloj molecular, es importante destacar que la elección de los puntos de calibrado es trascendental, ya que los tiempos de divergencia estimados varían en función de éstos (Bromham *et al.* 1999), y que no existe una relación universal entre distancia y tiempo, varía entre especies y genes, y hay que estimarla para cada nuevo *set* de datos.

La hipótesis de reloj molecular, a su vez, da pie (Dietrich 1994; Suárez & Barahona 1996) a la **Teoría Neutral**, según la cual Kimura & Ohta (1971) intentan explicar el rango evolutivo constante y diferencial en las proteínas. Los autores sugieren que la mayor parte de cambios son neutrales, no afectan a su función, por lo que no son regulados por la selección natural. Proponen que muchos cambios moleculares tienen efectos insignificantes en la eficacia biológica *-fitness-*, y que las mutaciones ventajosas afectando al fenotipo, son raras. De la combinación de ambas teorías, se puede deducir que, bajo neutralidad, la tasa evolutiva en especies o ratio de sustitución (mutaciones fijas por generación, dato inferido por la comparación de secuencias de diferentes especies) es igual al ratio de mutación en individuos (mutaciones por gameto por generación).

Por otro lado, cabe señalar, que se han descrito desviaciones en el modelo, sugiriendo la existencia de un reloj molecular relajado, ante la posibilidad de que algunas ramas de la filogenia tengan una tasa evolutiva más rápida que otras, en lugar de acumular diferencias de forma constante, siendo diversas las fuentes de variación (Gillespie 1991).

En un primer momento, el árbol de genes (o la red de haplotipos) se considera la herramienta principal en filogeografía. Un análisis básico incluye su estimación y el establecimiento de relaciones entre sus ramas y eventos históricos en un contexto geográfico (Nielsen & Beaumont 2009). Sin embargo, ciertas limitaciones en la inferencia de la historia ancestral de las especies (muchos eventos han ocurrido en el pasado –cuellos de botella, expansiones, migración,..– y los linajes génicos pueden perderse por azar), han promovido el desarrollo de nuevos métodos de análisis, así como el uso de un análisis combinado con diferentes métodos o aproximaciones. Se formaliza, de esta forma, el estudio de patrones geográficos de variación genética a través del árbol de genes, resaltando la importancia de definir hipótesis filogeográficas para ser contrastadas a nivel poblacional, más que a nivel de árbol de genes (Brito & Edwards 2009).

En una población de tamaño constante y a lo largo de las generaciones, bajo neutralidad, aparecen nuevos alelos por mutación y se pierden otros por deriva génica. Como se ha descrito anteriormente, los alelos de un gen en una generación derivan o encauzan hacia un único alelo ancestral, la ascendencia se traza hacia atrás en el tiempo hasta que los diferentes linajes coinciden, es decir, cuando comparten el mismo antepasado (Rosenberg & Nordborg 2002; Ballard & Whitlock 2004). Esta idea, junto con la percepción de que para una gran clase de modelos demográficos, caracterizados por neutralidad selectiva y tamaño poblacional restringido, la estructura estocástica de la genealogía no depende del mecanismo reproductivo, y que el efecto de mutación es estadísticamente independiente de la genealogía, dieron forma a la **Teoría de la Coalescencia** (Kingman 1982b; Kingman 1982a; Hudson 1983; Kingman 2000), cuya formulación matemática abrió un nuevo campo de posibilidades. La coalescencia es un modelo matemático que conecta los modelos demográficos con árboles de genes (Nielsen & Beaumont 2009), al describir las relaciones históricas entre linajes de genes como una función de parámetros demográficos, sentando así las bases para desarrollar estimadores de parámetros filogeográficos como tamaño poblacional histórico, tiempos de divergencia, tasas de migración entre poblaciones o el número de generaciones que separan al ancestro común más reciente (MRCA) de un individuo del presente (Jorde *et al.* 1998; Rosenberg & Nordborg 2002; Hey & Machado 2003). La teoría de Coalescencia no sólo es una herramienta de modelaje matemático, también proporciona un marco

metodológico y estadístico para testar hipótesis filogeográficas (Hickerson *et al.* 2010), destacando como herramienta de simulación en el análisis exploratorio de datos, y motor en análisis de verosimilitud completa (*full-likelihood*) de modelos evolutivos (Rosenberg & Nordborg 2002). Así, los análisis filogeográficos, que históricamente se abordaban a través árboles de genes (o redes de haplotipos) y/o estadísticos tradicionales, pasan a centrarse en métodos mixtos con las ventajas de los dos anteriores, lo que supone un gran avance y un aumento de la rigurosidad estadística (Hey & Machado 2003). Estos híbridos son métodos estadísticos basados en simulación (estadística computacional), que emplean un modelo coalescente explícito para estimar los parámetros (Nielsen & Beaumont 2009), a la vez que contrastan hipótesis históricas *a priori*. En consecuencia, la historia demográfica no es interpretada directamente de una genealogía (Hickerson *et al.* 2010), si no que se infiere el mejor árbol bajo unos datos, siguiendo un modelo particular, y a partir de éste se estiman parámetros demográficos, como ratio mutacional de la población, crecimiento o declive de las poblaciones, tiempo de divergencia y ratios de migración (Hey & Machado 2003).

La relación entre tamaño efectivo –número de copias de un gen– de la población y el tiempo de coalescencia es directa, porque la probabilidad de que dos secuencias coincidan en un punto está en función del tamaño de la población (Rosenberg & Nordborg 2002). De esta forma, el tiempo de coalescencia depende de procesos poblacionales como fluctuación del tamaño poblacional, selección natural o variaciones en el flujo génico. Los factores demográficos determinan los tamaños poblacionales, mostrando la intrincada relación entre demografía y filogenia de genes, de manera que las variables demográficas son elementos decisivos que gobiernan la profundidad, la forma y los patrones de árboles de genes, pudiéndose concluir que la demografía determina la dinámica de los procesos de ramificación y coalescencia de linajes.

En este nuevo marco estadístico de modelos fundamentados en la teoría de coalescencia, se incluyen métodos basados en verosimilitud, en inferencia bayesiana y simulaciones mediante algoritmos de Monte Carlo con Cadenas de Markov (MCMC) (Kass *et al.* 1998; Holder & Lewis 2003; Nielsen & Beaumont 2009). Dos programas que implementan estas nuevas técnicas computacionales, y se utilizan en los trabajos de esta tesis, son: IMA2 y BEAST. BEAST es un paquete computacional que implementa un

método bayesiano que incorpora coalescencia y MCMC para estimar demografía histórica (Drummond *et al.* 2005), determinando, a la vez, tiempos de divergencia, topología del árbol y ratios de evolución molecular. Siendo, el bayesiano, una rama de la estadística que se centra en la probabilidad posterior, y que tiene como ventaja, frente a otras aproximaciones, que simultáneamente estima árboles y medidas de incertidumbre para cada rama (Holder & Lewis 2003). El análisis bayesiano –en cuyo uso fueron pioneros Thorne *et al.* (1998) o Kishino *et al.* (2001) entre otros– parte de un modelo específico y una distribución *a priori*, e integra el producto de ambos sobre todos los posibles valores de los parámetros, para determinar la probabilidad posterior para cada árbol (Holder & Lewis 2003; Nielsen & Beaumont 2009). En este análisis, la hipótesis óptima es la que maximiza esta probabilidad posterior y proporciona el árbol más probable de ser explicado por los datos (Huelsenbeck & Ronquist 2001). IMA2 (Hey 2010a, b) implementa un algoritmo MCMC para inferencia bayesiana y verosimilitud a fin de examinar el modelo de aislamiento con migración (*isolation-with-migration model*) (Nielsen & Wakeley 2001). A partir de este modelo, el *software* permite la estima del tiempo de división desde que una población ancestral se separa en dos, los tamaños poblacionales históricos y contemporáneos, y los ratios de intercambio de genes desde la divergencia (Hey & Machado 2003). El método de optimización numérica de Monte Carlo con Cadenas de Markov permite una computación factible al estimar la distribución posterior del *set* de parámetros, concentrándose en la porción del espacio con mayor probabilidad. Según este algoritmo, se propone un estado en cada generación derivado del anterior, si la probabilidad posterior de éste es mejor que su predecesor, se acepta y se usa como modelo para la siguiente generación, la repetición de este proceso durante suficientes generaciones determina una exploración eficiente del espacio de parámetros, obteniendo una muestra muy representativa de la distribución posterior real (Kass *et al.* 1998), aunque siempre es recomendable eliminar los primeros estados de incerteza (*burn-in*). El tipo de MCMC implementado en BEAST e IMA2 es el algoritmo Metropolis-Hastings (Metropolis *et al.* 1953; Hastings 1970). Las ventajas de estos métodos bayesianos basados en MCMC frente a los de máxima probabilidad, es que permiten incertezas en las fechas de calibración y que proporcionan distribuciones posteriores estables sobre nodos de tiempo en árboles que cubren periodos de tiempo evolutivo más largos (Brown *et al.* 2008).

Diferentes regiones del genoma pueden tener historias coalescentes diversas, distinto tamaño efectivo poblacional y evolucionar con tasas desiguales, por tanto el genoma es una colección de árboles de genes que pueden explicarse con diferentes topologías, todos correctos, pero distintos entre sí y diferentes del árbol de especies (Brito & Edwards 2009). La genealogía de genes no refleja directamente la historia de las poblaciones (Nielsen & Beaumont 2009; Taylor & Friesen 2012), por eso se necesitan árboles de poblaciones o de especies. La introducción del **árbol de especies**, que son árboles filogenéticos en los que sus puntas representan linajes, poblaciones o especies en lugar de genes, es un gran avance en este campo (Brito & Edwards 2009; Edwards 2009), sobre todo para la estimación de tiempos de divergencia. El árbol de especies especifica relación ancestral (topología del árbol), el tiempo en que especies ancestrales se separaron en dos (tiempos de divergencia) y la historia de tamaño poblacional para cada especie (Heled & Drummond 2010). El tiempo de separación de especies o poblaciones es difícil de estimar correctamente debido a las diferencias entre el tiempo de divergencia de poblaciones y de genes. Es importante tener en cuenta que esta discrepancia es menor en eventos más distantes en el pasado y crítica en eventos recientes, como la diversificación en el Pleistoceno, además de que el tiempo de divergencia de genes, normalmente sobreestima el tiempo de divergencia de poblaciones (Knowles & Maddison 2002). Cuanto mayor sea el intervalo de tiempo entre eventos de ramificación de especies respecto al intervalo entre eventos de ramificación de linajes dentro de especies, árboles de genes y especies serán más similares (Rosenberg & Nordborg 2002).

La discrepancia entre árboles de genes y árboles de especies puede deberse a duplicación o extinción génica, transferencia horizontal y separación de linajes. La presencia de una ancestral, pero rápida, divergencia, como radiaciones adaptativas, también puede desencadenar discordancias entre ambos tipos de árboles (Rosenberg & Nordborg 2002). Sin embargo, la fuente principal de inconsistencias entre árboles es uno de los eventos que ha provocado más confusiones en el análisis de árboles de genes, la separación incompleta del linaje por retención del polimorfismo ancestral (Rannala & Yang 2003; Maddison & Knowles 2006; Nielsen & Beaumont 2009; Heled & Drummond 2010). Este proceso se produce cuando los linajes genealógicos todavía no se han ordenado a sí mismos en especies, por lo que algunos linajes se dan en más de un taxón (Ballard & Whitlock 2004). Si el tiempo necesario para que coalescan dos alelos dentro

de una población es mayor que el intervalo entre eventos sucesivos de especiación, puede observarse que individuos entre poblaciones están más relacionados entre sí, que individuos dentro de las poblaciones (Nielsen & Beaumont 2009). Por tanto, para inferir árboles de especies, además de considerar el proceso de sustitución nucleotídica (dentro del linaje genético), hay que tener en cuenta el proceso de separación de linajes genéticos dentro de poblaciones (entre linajes genéticos) (Maddison & Knowles 2006).

4.2 Biología de la Conservación

Concepto: Preservación de la Biodiversidad

La identificación de especies amenazadas, su distribución y los hábitats en los que se encuentra es un paso fundamental en la conservación de la biodiversidad (Mace 1995). No sólo es importante catalogar las especies en peligro de extinción, sino también identificar los eventos que han podido afectarlas y cómo revertirlos, pero sobre todo aportar las bases para conservar no sólo las especies, sino las unidades evolutivas dentro de ellas, con lo que es posible preservar los procesos evolutivos indispensables para la permanencia de las especies a largo plazo, y los factores evolutivos asociados (Moritz 1994; Crandall *et al.* 2000). El ingrediente primordial para el cambio evolutivo es la variación genética, ya que aumenta la capacidad de los individuos a adaptarse a cambios en el ambiente (Frankham 1997), así que garantizarla es esencial.

En los últimos años las poblaciones de reptiles han disminuido rápidamente en el mundo (Bologna 2004). No sólo se han observado declives locales en poblaciones de lagartijas, sino que se estima que una de cada cinco especies está amenazada (Böhm *et al.* 2013). En este aspecto, la lista roja de especies amenazadas de la IUCN es la mejor fuente de información sobre el estatus de conservación de fauna y flora (Blondel *et al.* 2010). De las 20 especies de *Podarcis* incluidas en esta lista (2014.2): una está en peligro crítico (CR), *P. raffonei*; tres tienen una categoría de en peligro (EN), *P. carbonelli*, *P. lilfordi* y *P. cretensis*; tres son vulnerables (VU), *P. gaigeae*, *P. milensis* y *P. lewendis*, y una está casi amenazada (NT), *P. pityusensis*; las doce restantes se catalogan como de preocupación menor (LC). De estas ocho especies con mayor grado de amenaza, siete son

endémicas e insulares, avalando la afirmación de que las especies endémicas están amenazadas en mayor medida y, por tanto, deben recibir una protección prioritaria para su conservación, y más aún si son especies insulares (Van Dyke 2008).

La actividad humana es uno de los factores principales que explican la composición actual de las comunidades de vertebrados (Williamson 1989), siendo, en los últimos años, la mayor causa de extinción en islas (Olson 1989). Esto es porque las islas son particularmente vulnerables a la influencia humana (Whittaker & Fernández-Palacios 2007), su patrón biogeográfico puede ser modificado por el hombre al promover colonizaciones y extinciones (Ficetola & Padoa-Schioppa 2009). Dos productos de esta actividad, la alteración de hábitats y la introducción de especies competidoras o depredadoras, son las amenazas más importantes a las que se enfrentan las lagartijas. Con la fragmentación y destrucción de hábitats, se aíslan poblaciones anteriormente interconectadas, creando *ghettos* genéticos cuyos problemas demográficos y genéticos se magnifican, a menos que se realice una intervención significativa (Moritz 1999). Por otro lado, las especies nativas insulares a menudo pierden su habilidad competidora o defensora (Deidun 2010), disminuye su capacidad de eludir depredadores o enfermedades, convirtiéndose en vulnerables para competidores, depredadores o parásitos (Cooper *et al.* 2006; Pafilis *et al.* 2008; Cooper *et al.* 2009; Hawlena & Pérez-Mellado 2009; Garrido *et al.* 2014). De todo eso puede deducirse que la introducción de fauna externa tiene importantes consecuencias ecológicas y evolutivas, ya que puede desencadenar el reemplazo de biotas nativos por otros no indígenas, provocando una seria amenaza a la biodiversidad (Williamson 1997; Primack 2006), al disminuir la diversidad global (Olden & Poff 2004).

La Biología de la Conservación se enfrenta a éstos, y otros problemas, a fin de impedir la pérdida de diversidad biológica, reduciendo el impacto del crecimiento y desarrollo de la población humana sobre ésta, así como restableciendo los procesos evolutivos y ecológicos que protegerán esta biodiversidad a largo plazo (Moritz 1999).

Our generation is the first to fully comprehend the threat of the biodiversity crisis and the last with the opportunity to explore and document the species diversity of our planet. Time is rapidly running out (Wheeler et al. 2004).

Herramientas: Unidades de Conservación

Una forma de frenar este proceso de cerco a las especies abocado al desastre es aplicar políticas de protección y estrategias de conservación, que incluyan actividades enfocadas al mantenimiento de ecosistemas y comunidades, así como una continua monitorización y actualización de conocimientos en cuestión de distribución y ecología de las especies (Bologna 2004). Una de las medidas de conservación implantadas para proteger la biodiversidad, consiste en identificar una serie de figuras o unidades de conservación por debajo del nivel taxonómico (Wan *et al.* 2004).

La idea de que deben conservarse: i) a las especies como unidades evolutivas, porque al hacerlo se preserva el potencial evolutivo y de especiación de la especie por ella misma; ii) a los organismos y a su capacidad para responder a cambios en el ambiente; iii) a las poblaciones y al potencial de éstas para originar nuevas especies, iv) a la entidad biológica y su contribución a la diversidad, así como v) al potencial de la entidad para aumentar su biodiversidad en años venideros, se formaliza en la idea de Unidad Evolutiva Significativa o ESU (*Evolutionary Significant Unit*) (Rojas 1992; Van Dyke 2008).

Ryder (1986) define por primera vez una ESU, como un grupo de organismos pertenecientes a la misma especie, que han estado aislados de otros grupos de ésta por un periodo de tiempo suficiente para haber desarrollado divergencias genéticas significativas entre ellos. Mientras que Walpes (1991) puntualiza que son poblaciones separadas reproductivamente, con adaptaciones diferentes o únicas, representando, por tanto, un componente importante del legado evolutivo de las especies (Crandall *et al.* 2000; Fraser & Bernatchez 2001). Posteriormente, Moritz (1994), centrándose más en la estructura poblacional histórica que en la adaptación actual, establece criterios genéticos para definir una ESU, a fin de asegurar que los linajes históricos principales están protegidos, y que el potencial evolutivo es mantenido (Moritz 2002). Una ESU *sensu* Moritz es un grupo de individuos, o poblaciones, aislados históricamente, que presentan monofilia recíproca para alelos mitocondriales, y divergencia significativa en frecuencias alélicas en *loci* nucleares, resaltando la importancia de mantener la herencia evolutiva dentro de especies (Moritz, 1994). Su identificación, por tanto, depende de una estructura genética

diferenciada, detectada con marcadores neutros combinados para evitar el sesgo (Chistiakov *et al.* 2006).

El concepto general de ESU ha evolucionado para intentar identificar y definir sus límites por medio de diversas definiciones. Aunque, originalmente presentaba dos componentes: el aislamiento histórico y reproductivo, así como la peculiaridad adaptativa, este último ha perdido relevancia en subsiguientes definiciones (Crandall *et al.* 2000). El mantenimiento de la diversidad adaptativa es importante para maximizar el éxito evolutivo (Lande & Shannon 1996; Lynch *et al.* 1999; Lynch & Ritland 1999), por lo que una de las críticas más destacadas es que no esté reflejado apropiadamente en el concepto de ESU *sensu* Moritz (Crandall *et al.* 2000; Fraser & Bernatchez 2001; Moritz 2002). Sin embargo, Moritz justifica la ausencia de este matiz en su concepto (enfocado exclusivamente en el aislamiento histórico inferido por datos moleculares), porque la preservación explícita de variantes adaptadas a condiciones previas, puede retrasar la respuesta a presiones selectivas contemporáneas, y, por tanto, el proceso evolutivo (Moritz 1994; Moritz 1999; Crandall *et al.* 2000; Moritz 2002), y, además, porque las diferencias fenotípicas reflejan tanto herencia, como divergencia adaptativa (Phillips & Ehlinger 1995). A su vez, concluye que hay que incidir en el mantenimiento de los procesos evolutivos (Frankel 1974), ya que la forma más efectiva de proteger el componente adaptativo de la diversidad es mantener el contexto para selección, es decir, poblaciones viables en ambientes heterogéneos (Moritz 2002). Otra crítica, hacia ESU *sensu* Moritz, es el empleo de un planteamiento exclusivamente genético para definir estas unidades, indicando que no puede reconocer todo el potencial adaptativo de la especie, y que sería más correcto evaluar los datos moleculares junto con datos históricos, ecológicos, sociales y de distribución. Crandall *et al.* (2000) otorgan más importancia, al delimitar ESUs, a la preservación de la diversidad funcional, que al legado histórico, por lo que distinguen poblaciones al enfatizar la variación en fenotipos, permitiendo la conservación de importantes caracteres adaptativos, y la variación genética subyacente. La designación de una ESU *sensu* Crandall se realiza mediante una valoración a nivel ecológico y genético, tanto reciente como histórico (Fraser & Bernatchez 2001).

Un aspecto en el que coinciden las diferentes definiciones de ESUs, es que son grupos con grandes particularidades genéticas y ecológicas, y que necesitan una

monitorización y gestión por separado, para garantizar su conservación y mantener así el potencial evolutivo necesario para hacer frente a cambios en el ambiente (Ryder 1986; Waples 1991; Moritz 1994; Crandall *et al.* 2000). Fraser & Bernatchez (2001) intentan unificar todos los conceptos de ESU, reuniendo los atributos positivos de cada uno bajo un marco de conservación, con el objetivo de preservar la varianza genética adaptativa. Los autores reconocen que una definición universal, rígida para todas las especies no es posible, y aceptan que unos criterios son más adecuados que otros en ciertas circunstancias, pudiendo usarse solos, o combinados, dependiendo de la situación. Bajo este marco conceptual, una ESU es un linaje con un flujo génico altamente restringido (Fraser & Bernatchez 2001).

Por debajo de la ESU, la figura de conservación es la Unidad de Manejo o MU (*Management Units*). Las MUs son poblaciones de individuos entre los cuales la conectividad es suficientemente baja para que cada población pueda ser monitorizada y gestionada separadamente (Palsbøll *et al.* 2007). El criterio genético para identificarlas es que presentan diferencias estadísticamente significativas en frecuencias alélicas en *loci* nucleares o ADNmt, aunque menores que las ESUs (Moritz 1994; Moritz 2002; Wan *et al.* 2004; Chistiakov *et al.* 2006), y su separación filogenética es substancial, pero no completa, es decir, muestran evidencias de relación genética, y además están organizados espacialmente (Van Dyke 2008). Por último, las Unidades de Acción (AU) y FN reflejan patrones genéticos, y son las figuras de conservación a niveles inferiores (Wan *et al.* 2004).

Básicamente, las ESUs derivan de una diferenciación genética histórica, por tanto hay que explorar la historia de las poblaciones e inferir las fuerzas demográficas (barreras geográficas, glaciaciones, cambios ecológicos,...) antes de proponerla (Wan *et al.* 2004), lo que significa que requiere información de la distribución y filogenia de alelos mitocondriales y nucleares (Moritz 1994; Moritz 1999). Mientras que las MUs se refieren a la estructura genética de poblaciones fragmentadas en la actualidad, requiriendo una determinación de la estructura genética reciente y patrones de dispersión y migración (Wan *et al.* 2004), siendo sólo pertinente información sobre frecuencias alélicas para delinearlas *sensu* Moritz.

En resumen, en el marco de esta tesis se emplea un género de reptiles propio del Mediterráneo, *Podarcis*, como modelo para, con la información obtenida en su material genético –mediante el análisis de marcadores moleculares específicos, aplicando técnicas moleculares, algoritmos bayesianos y herramientas basadas en la teoría de coalescencia– y su comparación con eventos geológicos y geográficos, inferir la huella filogeográfica, identificando así, los procesos que podrían haber determinado el origen, distribución y mantenimiento de la biodiversidad. Por otro lado, el riesgo de extinción descrito dentro de este género hace necesaria su valoración desde el punto de vista de la biología de la conservación. Es esencial que las especies evolucionen para mantener el potencial genético que les permitirá adaptarse e innovar ante cambios en el ambiente (Van Dyke 2008), por tanto, ante las amenazas identificadas, y con el objeto de promover la conservación de las especies y de sus hábitats, se propone el establecimiento de figuras de conservación, como ESUs.

OBJETIVOS

La región Mediterránea es un área de gran biodiversidad, y el género *Podarcis* está representado con un gran número de especies insulares. Dentro del *cluster* de Islas del Mediterráneo Occidental están incluidas cuatro especies endémicas: dos propias de las Islas Baleares, *Podarcis lilfordi* y *Podarcis pityusensis*, una del Archipiélago Maltés, *Podarcis filfolensis*, y una originaria de Córcega y Cerdeña, *Podarcis tiliguerta*. El objetivo de esta tesis es analizar en profundidad la historia evolutiva de estas especies, identificar los principales linajes de cada taxón e inferir qué eventos pudieron dar lugar al patrón que se observa en la actualidad. Para ello, hay que estimar la variabilidad y estructura genéticas, así como definir la distribución de los principales linajes observados en *Podarcis pityusensis*, *Podarcis filfolensis* y *Podarcis tiliguerta*, datar los nodos, y compararlo con resultados previos para *Podarcis lilfordi*.

De esta forma, los objetivos concretos son:

- ↪ Analizar la variabilidad genética, la estructura y la historia biogeográfica de *Podarcis pityusensis* mediante cinco fragmentos mitocondriales y 15 *loci* microsatélites.
- ↪ Examinar la diversidad genética e identificar y datar los principales linajes de *Podarcis filfolensis* mediante marcadores nucleares (11 microsatélites y un fragmento del gen *c-mos*) y mitocondriales.
- ↪ Determinar la variabilidad genética y la historia evolutiva de *Podarcis tiliguerta* mediante cinco fragmentos mitocondriales.
- ↪ Identificar, en todos los taxones, unidades evolutivas significativas que permitan proponer criterios más efectivos para su conservación, a fin de mantener el potencial evolutivo de las especies.
- ↪ Analizar la filogenia del Clado de Islas del Mediterráneo Occidental e identificar los eventos geográficos que dieron lugar a la distribución observada.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material de estudio

En conjunto se han estudiado para uno u otro marcador y/o estudio un total de 253 individuos, pertenecientes a nueve especies: 84 *Podarcis pityusensis*, 79 *Podarcis lilfordi*, 33 *Podarcis filfolensis*, 41 *Podarcis tiliguerta*, seis *Podarcis hispanica*, cuatro *Podarcis sicula* y dos *Podarcis muralis*, *Podarcis vaucheri* y *Podarcis carbonelli*. Los individuos se cazan con lazo, se secciona un trozo de cola, que se conserva en alcohol absoluto hasta su análisis, y se liberan en el mismo sitio.

Cubriendo el rango de distribución natural (Islas Pitiusas), y 22 de las 23 subespecies, cuarenta localidades de *Podarcis pityusensis* se muestrean durante la primavera-verano de 2007 a 2010, con el permiso del Gobierno Balear (CAP09/2010), obteniéndose de uno a cinco especímenes en cada una (Capítulo I).

Dos visitas al archipiélago, en septiembre del 2007 y mayo de 2008, con licencia expedida por MEPA (*Environment Protection Directorate of Malta*; permiso NP00051/07), permiten muestrear *Podarcis filfolensis* de nueve localidades del Archipiélago Maltés (dos a ocho individuos por localidad) y de dos Islas Pelágicas (Linosa y Lampione) (Capítulo II).

Por último, en mayo de 2011 se visita Córcega y Cerdeña, con autorización del CERFA (*Corsican Regional Government*, permiso No. 13616*01) y el Ministero dell' Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (permiso No. DPN-2010-0017564), y se obtiene material de especímenes *Podarcis tiliguerta* en 15 localidades de Córcega y 17 de Cerdeña (e islas), y de *Podarcis sicula* en otras cuatro (Capítulo III).

En esta investigación se analizan también individuos pertenecientes a otras especies de *Podarcis*, que se emplean como *outgroups*: *Podarcis hispanica* procedentes de Don Benito (Badajoz), Burjassot (Valencia), Peñagolosa (Castellón), Sajazarra (La Rioja) y Cabrerizos (Salamanca); *Podarcis muralis* de Peñagolosa (Castellón) y La Pinilla (Segovia); un individuo de *Podarcis vaucheri* originario de las Islas Chafarinas y

otro de Oukaïmeden (Marruecos); una *Podarcis carbonelli* de Salamanca (Laguna San Marcos) y otra de Portugal (Lagoa Comprida, Sierra Estrela).

2. Análisis moleculares

2.1 Extracción ADN genómico

El ADN genómico total se extrae a partir de un trozo de cola, mediante un protocolo estándar de extracción proteinasa K-fenol-cloroformo (Sambrook *et al.* 1989), con pequeñas modificaciones:

- **Preparación del tejido.** La fracción de cola se sumerge en agua destilada autoclavada, para su reblandecimiento. Tras una hora de incubación, se corta en pequeñas rodajas empleando material estéril (bisturí, pinzas y portaobjetos).
- **Homogenización y lisis celular.** Se añade tampón de lisis (Tris-HCl 10mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, 0.45% Ipegal CA-630, 0.45% Tween[®]20; pH final 8) al tejido, y se disgrega mediante un *potter*. Los detergentes incluidos en el tampón facilitan la rotura de la membrana lipídica, provocando la liberación del ADN del interior de las células, que es protegido por las sales al formar una capa iónica que lo recubre. Posteriormente, se añade proteinasa K (20mg/ml) y dodecil sulfato sódico (SDS) al 20%, que degrada y desnaturaliza las proteínas respectivamente, y se incuba en un baño a 37°C toda la noche (o/n).
- **Purificación.** Los restos celulares se eliminan mediante tres extracciones, donde el fenol elimina proteínas (como nucleasas) y el cloroformo residuos lipídicos: i) extracción con fenol, ii) extracción con fenol y cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y iii) extracción con cloroformo-álcool isoamílico (24:1).

-
- **Precipitación.** La incubación con etanol absoluto y cloruro sódico 5M a -20°C o/n promueve la precipitación del ADN. Un lavado posterior con etanol 70% elimina las sales de la solución. Tras la eliminación de las trazas de alcohol, el ADN obtenido se resuspende en agua Milli-Q (ultrapura) autoclavada.

2.2 Cuantificación ADN

La cuantificación se realiza con *GeneQuant II RNA/DNA Calculator* (Pharmacia Biotech) en c. 60% de las muestras. Previo a la cuantificación es necesario realizar una dilución de ADN en agua Milli-Q autoclavada (3/70 µl). La dilución se introduce en una cubeta de cuarzo, que se coloca dentro del fotómetro y se realiza la lectura; para obtener la concentración de ADN real de la muestra, se multiplica ésta, por el factor de dilución. El resto de las muestras se cuantifican con el espectrofotómetro *NanoDrop*[®] ND-1000 (Thermo Scientific). En este caso, se pipetea 2 µl de muestra directamente en la hendidura del cuantificador, y se obtiene una lectura directa de la concentración de la muestra. Independientemente del uso de uno u otro dispositivo, previamente a la lectura de la muestra, hay que analizar un blanco. El cambio en el procedimiento para cuantificar las muestras se debe a la modernización del equipamiento.

2.3 Amplificación y secuenciación de genes

En los trabajos reunidos en esta tesis se amplifican y secuencian seis fragmentos parciales, cinco mitocondriales y uno nuclear. Estos fragmentos son: (i) ARNr 12S (Kocher *et al.* 1989), dos fragmentos del citocromo b (cytb), (ii) uno más corto con parte de ARNt_{Glu} (Palumbi 1996), y (iii) otro mayor con parte del ARNt_{Thr} (Fu 2000), (iv) región control (Brehm *et al.* 2003), (v) dos subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND1 y ND2), con tres ARNt asociados (ARNt_{Ile}, ARNt_{Gln}, y ARNt_{Met}) (Macey *et al.* 1998) y (vi) el proto-oncogen *c-mos* (Saint *et al.* 1998).

Tabla 1.- Primer usados en la amplificación y secuenciación.

Primers	Secuencia	Referencia	Producto*
ARNr 12S			
L1091	5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'	Kocher <i>et al.</i> (1989)	455 pb
H1478	5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'		
Región Control			
L15022	5'-TACCCTTGCTCATAGCATAACTG-3'	Modificado de Brehm <i>et al.</i> (2003)	545 pb
H00292	5'-GTCTTGTTGACTGTAATTAACCGATA-3'		
ND1-ND2			
L4178a	5'-CARCTWATACACYTACTATGAAA-3'	Macey <i>et al.</i> (1998)	860 pb
H4980	5'-ATTTTCGTAGTTGGGTTTGRTT-3'		
Citocromo b			
L14724	5'-TGACTTGAARAACAYCGTTG-3'	Palumbi (1996)	470 pb
H15175	5'-CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'		
L14143	5'-CGTTGTATTCAACTATTAAY-3'	Este trabajo	455 pb
L15347	5'-CATGAACTGGATCAAACAACCC-3'	Fu (2000)	600 pb
H15915	5'-GTCTTCAGTTTTTGGTTTACAAGAC-3'		
<i>c-mos</i>			
G73	5'-GCGGTAAAGCAGGTGAAGAAA-3'	Saint <i>et al.</i> (1998)	396 pb
G74	5'-TGAGCATCCAAAGTCTCCAATC-3'		

*Tamaño del producto, incluyendo los *primers*.

Los fragmentos se amplifican mediante técnicas convencionales de PCR (Mullis *et al.* 1986) en termocicladores GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con los *primers* y ciclos especificados en las tablas 1–2. El volumen de reacción es de 25 µl, y contiene tampón 1x (con 1.5 mM MgCl₂), 0.2 mM de cada dNTP, ambos *primers* a una concentración de 0.4 µM, una unidad de ADN polimerasa DyNAzyme II (Thermo Scientific) y 320 ng de ADN. El *c-mos* se amplifica en un volumen de 50 µl, con tampón 1x (con 1.5mM MgCl₂), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, la pareja de *primers* a una concentración de 0.12 µM, 0.5 U de ADN polimerasa DyNAzyme II (Thermo Scientific) y 80 ng de ADN. En todas las amplificaciones se incluye un control negativo.

Tabla 2.- Ciclos de amplificación.

Fragmento	Ciclos
Citocromo b	96°C 5', 30 ciclos x (94°C 1', 50/55°C* 1', 72°C 1'), 72°C 5'
ARNr 12S	96°C 5', 30 ciclos x (94°C 1', 50°C 1', 72°C 1'), 72°C 5'
Región Control	96°C 5', 30 ciclos x (94°C 1', 50°C 1', 72°C 1'), 72°C 5'
ND1-ND2	96°C 5', 30 ciclos x (94°C 35", 40°C 35", 70°C 2'30"), 72°C 5'
<i>c-mos</i>	96°C 3', 35 ciclos x (94°C 45", 50°C 45", 72°C 1'), 72°C 6'

*temperatura de *annealing* de 50°C para el par L15347/ H15915 y de 55°C para el par L14724/ H15175.

En un gel de agarosa, al 1% y teñido con bromuro de etidio, se separan en una electroforesis los productos de PCR, paralelamente a un marcador de peso molecular. Al término de ésta, se visualiza el patrón de bandas obtenido, al exponer el gel a luz UV en el analizador de imagen, para descartar, de esta forma, la presencia de bandas secundarias o contaminaciones en el control negativo, y comprobar el tamaño esperado de los fragmentos. Las muestras amplificadas correctamente se purifican con el kit MSB® *Spin PCRapace* (Invitex, siguiendo las instrucciones del fabricante), que es un sistema rápido de columnas de sílice que permite limpiar los productos amplificados al eliminar dNTPs, *primers*, sales y restos de la Taq.

Una vez cuantificados los purificados, se inicia la reacción de secuenciación. Para cada muestra y fragmento se secuencian ambas cadenas por separado (L y H): sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*). En este caso, las condiciones de secuenciación son 3 minutos a 96°C, 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C. Y la reacción se realiza en un volumen de 10 µl, conteniendo 0.2 µM de *primer* (se pone uno u otro cebador, *forward* o *reverse*, en función de la cadena a secuenciar), el purificado (a una concentración específica dependiente del tamaño del producto a secuenciar) y el tampón y *premix* del kit *BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle sequencing* (Applied Biosystems, siguiendo las recomendaciones del fabricante). Este producto se basa en el método de terminadores de cadena descrito por Sanger *et al.* (1977): en el *premix* se incluyen tanto dNTPs, como ddNTPs, que son nucleótidos marcados con un fluorocromo. Cuando uno de estos terminadores (ddNTP) se incorpora (al azar) a la cadena, durante la elongación, impide la incorporación de nuevos nucleótidos, deteniendo así la síntesis de ADN. En consecuencia, al finalizar la reacción se obtiene una variedad de fragmentos de diferente longitud, marcados con un fluorocromo específico; un número elevado de ciclos permite que la síntesis se interrumpa para cada posición de la secuencia. Al igual que tras la amplificación, hay que eliminar restos de *primers*, sales y, en este caso, también terminadores, por lo cual los productos de secuenciación se precipitan. En un primer paso, se incuban en hielo con etanol absoluto frío y acetato sódico 3 M, para, tras su centrifugación y eliminación del sobrenadante, limpiar el precipitado con etanol 70%, concentrar el *pellet* mediante centrifugación y secarlo en la bomba de vacío. Por último, las muestras se resuspenden en agua Milli-Q autoclavada y se analizan en el secuenciador automático (ABI PRISM 3730/3130 Applied Biosystems). La movilidad electroforética

y la detección del fluorocromo por el sensor permite establecer una relación entre longitud del fragmento y fluorocromo específico, es decir posición dentro de la secuencia y nucleótido específico, de esta forma se completa toda la secuencia.

2.4 Diseño de microsatélites

A partir de una biblioteca genómica de *P. lilfordi* enriquecida para AAAG, se desarrollan 24 *loci* de tipo microsatélite, siguiendo la metodología descrita por Gardner *et al.* (1999), con algunas modificaciones. Una vez se obtienen los *primers*, éstos se prueban en diversas muestras de todas las especies, en una reacción de amplificación convencional y posterior visualización en gel de agarosa. Se realizan diversos ensayos en los que se modifican las condiciones de amplificación –a nivel de reactivos y temperatura de *annealing*– a fin de poner a punto las condiciones más óptimas. Sin embargo, hay que descartar, en este paso, seis *loci* (Pli1, Pli7, Pli11, Pli13, Pli15, Pli20) porque no amplifican en todas las especies, u originan productos secundarios, lo que dificultaría su posterior lectura e interpretación. Los *primers* (Tabla 3) para el resto de microsatélites se marcan con fluorescencia (6-FAM, NED, VIC o PET) para iniciar la valoración de la amplificación con ellos y posterior análisis de fragmentos. Tres *loci* (Pli14, Pli19, Pli23) son descartados en esta fase por la observación de muestras que presentan más de dos picos en el cromatograma.

Paralelamente, se amplifican y secuencian una media de dos homocigotos de cada *loci* para conocer la secuencia de éstos y determinar la correspondencia entre el tamaño en pares de bases (pb) obtenido en el análisis de fragmentos, y el número de repeticiones del *core* observado en su secuencia (Tabla 4, Fig. 9B). El objetivo era, que conociendo la relación entre pb y el alelo correspondiente, poder extrapolar la asignación alélica al resto de muestras. Sin embargo, tras observar *indels* en varias secuencias (entre 1 y 49 pb), parecía más correcto indicar simplemente los alelos en función de su longitud, en pb. Esto es un claro ejemplo del inconveniente de la homoplasia, descrita por otros autores en la bibliografía (ej. Garza & Freimer, 1996) para este tipo de marcador. Al asumir que el polimorfismo está en el tamaño (y omitir la secuencia), se asignan como iguales alelos diferentes, pertenecientes a diversos linajes. No se puede descartar que este mecanismo

esté ocurriendo en el resto de *loci* analizados. La variación no sólo se presenta en la estructura en sí del STR, sino también en la zona flanqueante amplificada por los *primers*. Algunas de las muestras secuenciadas para tres microsatélites (Pli12, Pli17 y Pli21), presentan deleciones de varias decenas de pares de bases (44, 36 y 49 pb, respectivamente), por lo que, para ellos, se diseñan nuevos *primers*, acortando la zona flanqueante.

Tabla 3.- *Primers*, temperaturas de *annealing* y marcaje para cada STR.

<i>Locus</i>	Secuencia de los <i>primers</i>	T _a (°C)	Fluorescencia
Pli2	5'-GATCAGGAAGGTAAAAGTGAGGA-3' 5'-CCCCCTAAATAGTGACCCTAAG-3'	56	6FAM-azul
Pli3	5'-CATGAAGGGAGGCGATGTAT-3' 5'-GATCCCATTCTGTCTTGAA-3'	56	VIC-verde
Pli4	5'-TCAGTTCATGCATAAGGTCCA-3' 5'-TTCGGCATTCTTCTCAGGT-3'	56	6FAM-azul
Pli5	5'-TGATATCCCGCTTTATCACTACC-3' 5'-CTGACTGATACCAGAATTGTTGC-3'	57	VIC-verde
Pli6	5'-ACATGTTGACGGGACTGGTA-3' 5'-CCCTGGAGGAGCTATGAATG-3'	56	NED-amarillo
Pli8	5'-CTCTGGGAGAAATGCGTGT-3' 5'-GGTCCCTTCCAGCTCTACAA-3'	56	VIC-verde
Pli9	5'-AGCAGGCACACACAAGTAGC-3' 5'-TTGTAGGGTAAGGCCACACA-3'	55.5	PET-rojo
Pli10	5'-TGACTTGTAGGGCTGGCTTT-3' 5'-AGCTGTTTCTCAGCTGTGGTC-3'	56	NED-amarillo
Pli12	5'-CAACAAAACCTTTGTAGAAGTTGG-3' 5'-GATCTTCTGGGCCCTCTCTT-3'	57	PET-rojo
Pli16	5'-GGGAGGTATCAGGCTGAGATT-3' 5'-CTCCAGCAGGAAGGTAAACG-3'	57	NED-amarillo
Pli17	5'-GTAATTGCAGCCACCACACA-3' 5'-ATTTGTTGCATTTATAGTGCATTT-3'	57	VIC-verde
Pli18	5'-CAAGAATTGAGTTTGCAGTTCC-3' 5'-TGTCTGACAGAATGTGCTTCTC-3'	55	NED-amarillo
Pli21	5'-CCATTATGACCTTGCTGGTG-3' 5'-GAACTCTGGTGGCCACAT-3'	57	VIC-verde
Pli22	5'-TGCCTTTATAGCCACCCATAC-3' 5'-CCATATCTGCCATCTGGTT-3'	55	VIC-verde
Pli24	5'-CCACAAGGACTCAGGCTCTC-3' 5'-TCCCCACTTAAGCATGTTTC-3'	55	PET-rojo

Como resultado, de los 24 *loci* obtenidos en un principio, sólo 15 resultan polimórficos y cumplen con los requisitos mínimos de amplificación, visualización e interpretación. El conjunto de 15 STRs se utiliza en los análisis para *P. lilfordi* y *P. pityusensis*, pero no es posible determinar los genotipos para cuatro de ellos (Pli5, Pli8,

Pli16 y Pli24) en *P. filfolensis* –por no amplificación de los alelos–, así que, en esta especie, sólo se emplean 11 STRs para su caracterización.

Tabla 4.- Alelos secuenciados, se indica el microsatélite y la muestra analizada, el número de repeticiones que se observa en el *core* y los pb obtenidos en el análisis de fragmentos y en la secuenciación.

STR	Core	Fragmento (pb)	Secuencia (pb)
Pli2			
*E3	(GAAA) ₁₀ (GGAA) ₈	252.58	248
*Pr3	(GAAA) ₁₁ GAGG (GGAA) ₉	263.92	260
Pli3			
Co14	GAAA GC (GAAA) ₁₃	259.15	254
D23	GAAA GC (GAAA) ₁₁	251.65	246
Pli4			
C7	GAAA GCA (GAAA) ₁₁ (GAA) ₂	380.34	385
D19	GAAA GCA (GAAA) ₁₁ GAGA (GAAA) ₄ (GAA) ₂	391.52	397
Pli5			
D9	(AAAG) ₉ AA AAAG	377.6	379
Pr6	TAAG AAAA (AAAG) ₁₁ AT AAAG	391.34	394
D23	(AAAG) ₁₁ AW AAAG	384.04	386
Pli6			
Co14	A (AAAG) ₁₁	402.53	408
Pr3	A (AAAG) ₁₂	405.66	412
D20	A (AAAG) ₁₁	401.7	408
Pli8			
C7	(GAAA) ₁₂	151.68	150
D25	(GAAA) ₁₁	147.23	146
D4v	(GAAA) ₁₂	151.91	150
D3v	(GAAA) ₁₁	146.88	146
Pli9			
C2	(GAAA) ₁₃ GAAG GA	401.42	401
C8	(GAAA) ₁₂ GAAG GA	397.32	396
D20	(GAAA) ₁₂ GAAG GA	397.35	396
Fx5	(GAAA) ₈ GAAG GA	382.33	381
Pli10			
D23	GAAA AAG (GAAA) ₉ GAGA AAAAG	259.45	257
C2	GAAA AAG (GAAA) ₁₀ GAGA AAAAG	263.15	261
Pli12			
D18	(GAAA) ₁₆ A GAAA GAGG	224.02	218
*Ef1	(GAAA) ₁₃ A GAAA GAGG	210.54	204
D25	(GAAA) ₅ A GAAA GAGG	177.45	174
Pli16			
D21	(GAAA) ₁₁ GA	455.91	462
*Pr6	(GAAA) ₁₇ GA	471.71	479
Pli17			
D21	(AAG) ₂ A (AAAG) ₉ AAG	247.5	247
Pli18			
Pr6	AGA (GAAA) ₁₂ CA	130.58	137
Co14	AGA (GAAA) ₁₃ GAA	134.91	141
D17	AGA (GAAA) ₁₀ GAA	122.9	129
Pli21			
D23	GAGA (GAAA) _{10.3}	136.36	136
Pli22			
D13	TC (CTGT) ₇	118.97	121
Pr6	TC (CTGT) ₄	106.62	109
Pli24			
D5v	(GTCT) ₅	112.71	112
D9	(GTCT) ₅	112.47	112

*En estas muestras se observan deleciones de 1–6 pb.

2.5 Genotipación de microsatélites

Los microsatélites se amplifican por PCR convencional (Mullis *et al.* 1986) en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems). La mezcla de reacción contiene un volumen de 10 µl con tampón 1x, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (Roche), 0.5 µM de cada *primer* (Tabla 3), 0.25 U de ADN polimerasa *DyNAzyme* II (Thermo Scientific) y 200 ng de ADN. Las condiciones de amplificación son 1 minuto a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos 94°C, 30 segundos a una temperatura de *annealing* específica para cada *locus* (Tabla 3) y 45 segundos a 72°C, con una extensión final de siete minutos a 72°C.

Los STRs que presentan una misma temperatura de *annealing* y no se solapan ni en rango de tamaño, ni en marcaje, se amplifican conjuntamente en forma de multiplex, ajustando los volúmenes de reactivos en función del número de *loci* a amplificar, y añadiendo una concentración creciente de *primers*, es decir, mayor concentración para STRs con alelos de mayor tamaño. El esquema o estrategia de agrupación en multiplex se va variando en función de las necesidades de amplificación.

En cualquier caso, para minimizar el número de carreras en el secuenciador, y por ende el gasto, se hace un *pooling* donde se agrupan los productos de PCR de diferentes STRs (del mismo espécimen), teniendo siempre en cuenta el marcaje del STR y el rango de tamaño en el que se mueve, para evitar un solapamiento que impedirían la lectura e interpretación de los alelos. Los productos de amplificación marcados se mezclan con un *mix* de formamida y estándar Liz-500 (Applied Biosystems), se incuban a 94°C cinco minutos y, tras parar la reacción al colocarlos en hielo, se llevan al secuenciador automático (ABI PRISM 3130, Applied Biosystems). En éste, los fragmentos se separan por tamaño en una electroforesis capilar.

3. Análisis de datos

3.1 Interpretación de secuencias y fragmentos

Secuencias

ADN

Los cromatogramas obtenidos del analizador genético tras la secuenciación, se editan y alinean (Fig. 8) con el *software* BioEdit v.7.0.5.2 (Hall 1999). En primer lugar, se comparan los picos del cromatograma con la sucesión de nucleótidos indicada en éste, para comprobar que no hay ningún error en la secuencia de nucleótidos. En algunos casos, a pesar de que el cromatograma muestra un pico para un nucleótido determinado, éste no ha quedado reflejado en la secuencia, o aparece como n (nucleótido indeterminado), si es posible hay que corregir este error. Paralelamente, se eliminan las regiones en las que la calidad de los picos no determine una buena asignación nucleotídica. Para cada fragmento amplificado, se secuencian independientemente ambas cadenas (L y H), una vez editadas, se alinean comprobando que ambas muestran una secuencia idéntica y se fusionan en una secuencia consenso definitiva, por individuo y fragmento. Para terminar de editar las secuencias, se elimina la región complementaria a ambos *primers*. Las secuencias obtenidas en esta tesis se han incluido en GenBank, los números de acceso, así como la correspondencia entre fragmentos e individuos, están especificados en el Anexo 3.

A partir de la secuencia definitiva para cada individuo, se elabora una matriz con todos los especímenes de la población y se alinea. Este proceso consiste en, añadiendo los menos *gaps* (-) posibles, conseguir el máximo número de semejanzas por columna a través de todas las secuencias. Un *gap* implica que el espécimen ha perdido un nucleótido o que los otros lo han ganado. Al alinear todas las secuencias, se obtiene la matriz definitiva, la cual puede guardarse en diferentes formatos en función del programa específico que se emplee para analizarla posteriormente.

los alelos (Fig. 9A) y se determina su tamaño, que es incluido en una base de datos para su posterior asignación alélica. Al ser STRs de nuevo desarrollo, a la vez que se genotipan las muestras, se van definiendo los alelos, así como los límites de asignación para cada uno de ellos. En el Anexo 4, se presentan las frecuencias alélicas para los *loci* STRs en todas las especies analizadas.

3.2 Diversidad genética

ADNmt

Varios estimadores describen la diversidad genética en secuencias. En los trabajos derivados de este tesis se incluyen el número de haplotipos, el número de posiciones variables, el número medio de diferencias entre dos secuencias, k , y la **diversidad nucleotídica** (π), que es el número de nucleótidos diferentes por sitio, entre dos secuencias tomadas al azar (Nei & Li 1979). Los parámetros de diversidad se computan con los programas DnaSP v. 5.10.01 (Librado & Rozas 2009) y MEGA v. 6 (Tamura *et al.* 2013).

Microsatélites

El número de alelos, el rango alélico, la heterocigosidad observada y esperada, junto con el estadístico M , se obtienen mediante el programa Arlequin v. 3.1.1 (Excoffier *et al.* 2005). El **estadístico M** (Garza & Williamson 2001), permite detectar cuellos de botella; se calcula al dividir el número de alelos, por el rango de tamaño total, y su valor abarca un rango desde 0 (cuello de botella) a 1 (población estable).

3.3 Test de neutralidad

La D de Tajima (Tajima 1983, 1989), estimadores F y D de Fu & Li (Fu & Li 1993), la H de Fay & Wu (Fay & Wu 2000) y la F_s de Fu (Fu 1997) son estadísticos que se calculan con el programa DnaSP v. 5.10.01 (Librado & Rozas 2009), y son empleados para examinar si los patrones observados de mutación en ADNmt son consistentes con

un modelo neutral de evolución molecular. El test de D Tajima (Tajima 1983, 1989) detecta las diferencias entre los estimadores π y θ , es decir, la diversidad nucleotídica y la tasa mutacional poblacional, siendo esta última una medida de las sustituciones nucleotídicas por sitio y por población. Por tanto, el test se basa en la relación entre el número medio de diferencias en pares de secuencias de ADN y el número total de mutaciones observadas. Un valor de D negativo, indica la presencia de mutaciones deletéreas, sugiriendo expansión poblacional o selección purificadora, una D positiva, indica que varios alelos se encuentran bajo selección positiva (o cuello de botella reciente), una D= 0 indica equilibrio neutral. Por último, el indicador F_s (Fu 1997) discrimina entre expansión reciente o deriva génica –valores negativos, que evidencian un exceso de alelos– y cuello de botella reciente o selección sobredominante –valores positivos, que evidencian déficit de alelos–.

3.4 Estructura poblacional

La estructura poblacional es la distribución de los genotipos en el espacio y el tiempo, y es resultado tanto del pasado histórico como de procesos presentes (Hewitt 1999). A continuación se presentan algunas aproximaciones utilizadas para inferirla:

Análisis Varianza Molecular

El análisis de varianza molecular o AMOVA permite identificar los componentes de la varianza entre alelos que pueden ser explicados en base a su distribución geográfica, y se infiere con el programa Arlequin v. 3.1.1 (Excoffier *et al.* 2005).

Red de haplotipos

El programa TCS v. 1.2.1 (Clement *et al.* 2000) utiliza un algoritmo de parsimonia estadística (Templeton *et al.* 1992) para inferir, con un límite de parsimonia, con una confianza de 95%, redes filogenéticas a partir de secuencias de ADN y establecer las relaciones entre los haplotipos en base al número mínimo de mutaciones.

Algoritmos de agrupamiento

Los algoritmos de agrupamiento o *clustering* permiten definir fronteras en el *pool* génico contemporáneo, emplean el desequilibrio de ligamiento en los *loci*, el cual sólo es estadísticamente detectable un par de generaciones tras la inmigración de genotipos únicos (Bohonak & Vandergast 2011), para conocer el número de poblaciones reales de un grupo de individuos. Se utiliza un programa u otro dependiendo de los datos con los que se trabaja: si son microsatélites, el programa por excelencia es STRUCTURE, si son secuencias, se utiliza BAPS; ambos basados en estadísticos bayesianos.

BAPS v. 5.3 (Corander *et al.* 2003) determina el número óptimo de poblaciones mediante el análisis *mixture*, para después asignar individuos a estos *clusters* (grupos) genéticos en el análisis *admixture*. La opción de *clustering with linked loci* permite análisis con secuencias de ADNmt.

STRUCTURE v. 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) utiliza genotipos de múltiples marcadores para determinar la estructura genética subyacente en un grupo de individuos, pudiendo detectar inmigrantes. Se asume un modelo en el que hay K poblaciones, cada una de ellas caracterizadas por un *set* de frecuencias alélicas en cada *locus*, para, posteriormente, distribuir los individuos entre éstas en función de sus genotipos, otorgándoles un coeficiente de asignación, y señalando la probabilidad para cada valor de K estimado. En los trabajos que engloban esta tesis los parámetros especificados en este programa son: estimas de K 1 a 20, 20 análisis independientes para cada K, 400.000 genealogías MCMC (descartando el 50% como *burn-in*), un modelo que asume mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones y ninguna asignación geográfica.

STRUCTURE se utiliza en combinación y de forma secuencial con dos programas adicionales: STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012), que está emplazado en una página web y permite visualizar *outputs* de STRUCTURE y ejecutar el estadístico formulado por Evanno *et al.* (2005) y CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007), que alinea y permuta estadísticamente los coeficientes de asignación entre replicados de análisis. Evanno *et al.* (2005) indican que *log probability of data* no siempre proporciona una estimación correcta del número de *clusters* (K) y proponen el estadístico ΔK , que se

basa en el ratio de cambio de esta probabilidad entre sucesivos valores de K, para inferir el numero K de *clusters*.

3.5 Modelos evolutivos

Los modelos evolutivos son modelos matemáticos usados para describir los patrones de sustitución del ADN, es decir, cómo evoluciona el *set* de secuencias. Obtener un modelo evolutivo que describa idóneamente este *set* es un prerequisite para obtener una buena inferencia bayesiana. En el transcurso de esta tesis se han utilizado dos herramientas de selección estadística para inferir el mejor modelo de sustitución nucleotídica: **MrAIC** v. 1.4.4 (Nylander 2004) y **jModeltest** v. 2.1.3 (Darriba *et al.* 2012), en ambos casos bajo el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Akaike 1974), que es un tipo de procedimiento para seleccionar entre los modelos evolutivos posibles, al medir la distancia esperada entre el modelo verdadero y el estimado, en su versión corregida para muestras pequeñas AICc. El cambio de programa se corresponde con sugerencias realizadas por revisores que han valorado los trabajos antes de su publicación.

3.6 Filogenia y datación de linajes (BEAST)

El paquete de programas BEAST v. 1.7.4 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (Drummond & Rambaut 2007; Drummond *et al.* 2012) es un método bayesiano con Metropolis-Hastings MCMC, que busca optimizar, dado un *set* de datos y un modelo evolutivo, el árbol con la máxima probabilidad posterior, que sería el que describe correctamente la historia del taxón estudiado.

Una extensión de BEAST es la opción *BEAST (*Species Tree Ancestral Reconstruction using BEAST*) (Heled & Drummond 2010; Drummond *et al.* 2012), indicada para la inferencia bayesiana de árboles de especies a partir de *multilocus* bajo un modelo coalescente multiespecie (Rannala & Yang 2003), que es un modelo de coalescencia génica dentro de un árbol de especies. *BEAST coestima múltiples árboles

de genes asignados a un árbol de especies compartido, así como los tamaños efectivos poblacionales de especies existentes y ancestrales; teniendo en cuenta en su procedimiento el polimorfismo ancestral y la separación incompleta de linajes. Heled & Drummond (2010) exponen que, aunque esté indicado el término especies en su nombre, no es necesario estar en el rango taxonómico, puede designarse y analizarse grupos de individuos que después de cierto tiempo de divergencia no tienen historia de reproducción con individuos fuera del grupo, el modelo define barreras al flujo génico y permite analizar especies, subespecies o cualquier estructura poblacional divergente. En los trabajos de esta tesis, con la metodología del árbol de especies, se estiman árboles de linajes, pues la unidad no es la especie, sino el linaje evolutivo. Definiéndose éste como un grupo de poblaciones reproductivas con suficiente historia de relaciones de ancestría-descendencia, la cual representa sus propias trayectorias y tendencias evolutivas (Templeton 2001).

El archivo de entrada para BEAST (formato .xml) se crea con una interfaz gráfica, BEAUTI, en la que se incluyen los datos moleculares, se especifican los parámetros del algoritmo MCMC y las descripciones concretas para cada análisis, entre otras los modelos evolutivos para cada partición, la selección de la extensión *BEAST, el calibrado del reloj molecular, el *prior* para árbol o los linajes monofiléticos.

En los trabajos de esta tesis, se infiere un árbol de linajes, por tanto se selecciona la extensión *BEAST y se agrupan las secuencias según los linajes principales identificados, definiendo las relaciones de monofilia entre ellos. Los fragmentos mitocondriales se analizan en forma de ocho particiones, por medio de la siguiente estrategia: ARNr 12S, región control, todos los ARNt concadenados, las primeras y segundas posiciones de codon de ND1/ND2, la tercera posición de codon de ND1/ND2 y una partición para cada posición en el citocromo b. Para cada una de las particiones se fija el modelo evolutivo que más se adecua a los datos. El calibrado del reloj molecular se realiza con respecto a un evento geológico, la Crisis Salina Mesiniense (véase Introducción, sección 1.2 Historia geológica), que determina la divergencia de *P. lilfordi* y *P. pityusensis*, al separar las Islas Gimnesias de las Islas Pítiusas y aislar los dos taxones de *Podarcis*, que a partir de entonces evolucionan independientemente. Los puntos de calibración son: el nodo *P. lilfordi*-*P. pityusensis* con una distribución $N(5.325, 0.0001)$

y el TMRCA para *P. lilfordi* y para *P. pityusensis* –basándose en estimas previas (Brown *et al.* 2008)– con las distribuciones G(3.48, 0.5) y G(5.8, 0.2), respectivamente. Se parte de un árbol al azar y se analizan entre 300–400 millones de generaciones MCMC, muestreando cada 10.000 pasos.

El *prior* para el árbol es el modelo que describe los procesos biológicos responsables de la generación del patrón de diversificación de linajes, concretamente el modelo de ramificación. Todos los análisis se llevan a cabo con un patrón de ramificación que sigue un proceso Yule (*pure-birth*)(Yule 1924). Este es un modelo simple de especiación –con un solo parámetro– apropiado cuando se consideran secuencias de diferentes especies. Este modelo asume que en un punto en el tiempo, cada linaje vivo puede sufrir un proceso de especiación con el mismo ratio (λ), pero no permite extinción. Como el ratio de especiación es constante en el tiempo, hay un tiempo de espera exponencial entre eventos de especiación.

Tras el análisis en BEAST, los archivos de salida MCMC (trace.log) se evalúan con TRACER v. 1.5 (Rambaut & Drummond 2007), para determinar si las cadenas han convergido, estimar el valor de *burn-in* a descartar, que por defecto indica un 10%, y evaluar el tamaño de muestra efectivo (ESS) para cada parámetro. El ESS es un indicador de si un parámetro se ha muestreado adecuadamente, da una estima de la confianza de los datos, de modo que valores mayores de 200 se consideran adecuados, y entre 700-800, muy buenos (Kass *et al.* 1998).

Con TREEANNOTATOR se descarta el *burn-in* y se resume la información de toda la muestra de árboles en uno, seleccionando el árbol que presenta la mayor suma de las probabilidades posteriores de todos sus nodos (*maximun sum of clade credibilities*). Con el programa FigTree v. 1.4.2 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) se visualiza el archivo de salida de Treeannotator, que es el árbol definitivo con las probabilidades posteriores y los tiempos de divergencia estimados sobre cada nodo.

3.7 Historia biogeográfica y demografía

(IMa2)

IMa2 (Hey 2010b, a) es una aproximación basada en coalescencia y algoritmo MCMC que incluye el modelo de *isolation with migration* (Nielsen & Wakeley 2001), es decir aislamiento y migración. Este modelo se define por seis parámetros (Fig. 10): una población ancestral de tamaño constante N_A , se separa en dos poblaciones, de tamaños N_1 y N_2 , en el tiempo t , con un intercambio génico que ocurre entre éstas desde la división, según los ratios m_1 y m_2 (en tiempo coalescente). El programa IMa2 permite inferir estos parámetros demográficos a través de estimadores escalados por el ratio de mutación: θ_A , θ_1 , θ_2 , t , m_1 y m_2 , y, de esta forma, estimar tiempo de divergencia, tamaños poblacionales histórico y contemporáneo, y ratios de intercambio de genes durante la divergencia.

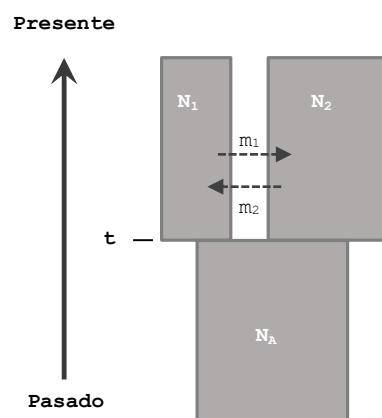


Figura 10. Modelo *isolation with migration*

Esta reconstrucción sólo se realiza para la especie *P. pityusensis*. En el análisis se incluyen 16 loci: 15 STRs (en los que se descartan *repeats* imperfectos), bajo un modelo mutacional *stepwise* (Kimura & Ohta 1978), y un fragmento mitocondrial de 2.430 pb, especificando un modelo mutacional Hasegawa–Kishino–Yano (Hasegawa *et al.* 1985). Tras realizar diferentes análisis exploratorios para optimizar límites superiores para los parámetros, y convergencia, se definen valores *a priori* uniformes para los estimadores: q_1 (θ_1), q_2 (θ_2), q_A (θ_A), t (T), m_1 (M_1) y m_2 (M_2), y un esquema de cadenas MCMC con 40 cadenas independientes *heated*, siguiendo un modelo geométrico y un total de $5 \cdot 10^6$ generaciones (descartando posteriormente un 10% como *burn-in*). Para comprobar la robustez de los análisis, se realizan cuatro replicados diferentes, obteniendo en todos ellos valores de ESS para los parámetros mayores de 200. Una vez se obtienen los valores de los estimadores (θ_A , T , θ_1 y θ_2 , M_1 y M_2), éstos se escalan a parámetros poblacionales usando una tasa de $6.075 \cdot 10^{-3}$ mutaciones por sitio y Ma, calculado con MCMC tree (Yang 2007) y un tiempo de generación de 2.09 años (Galán 1999).

RESULTADOS

CAPÍTULO I:

ISLAS BALEARES



Polymorphic microsatellite loci for the Balearic Island Lizard *Podarcis lilfordi* (Squamata: Lacertidae)

P. Bloor, V. Rodríguez, B. Terrasa, R.P. Brown, V. Pérez-Mellado,
J.A. Castro, A. Picornell, M.M. Ramon

Conservation Genetics Resources (2011) 3: 323–325

Multilocus genetic diversity and historical biogeography of the endemic wall lizard from Ibiza and Formentera, *Podarcis pityusensis* (Squamata: Lacertidae)

V. Rodríguez, R.P. Brown, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado,
J.A. Castro, A. Picornell, M.M. Ramon

Molecular Ecology (2013) 22: 4829–4841

En este primer capítulo, se integran dos secciones diferentes, siendo el nexo común de ambas que el área de distribución son las Islas Baleares. Como el organismo modelo de esta tesis pertenece al género *Podarcis*, este apartado encuadra el estudio de los dos representantes del género que habitan en el Archipiélago Balear: *Podarcis lilfordi* y *Podarcis pityusensis*. La primera sección corresponde a *Podarcis lilfordi*, e incluye dos trabajos: el diseño y caracterización de un conjunto de nuevos microsatélites específicos para la especie, y un análisis preliminar de la lagartija balear con estos *loci* microsatélite. *Podarcis pityusensis* es la protagonista del resto del capítulo, también con dos trabajos: la filogeografía de la especie, y un análisis preliminar sobre poblaciones introducidas de la lagartija pitiusa.

***Polymorphic microsatellite loci
for the Balearic Island Lizard
Podarcis lilfordi (Squamata: Lacertidae)
(Bloor et al.
2011)***

Veintiséis individuos de *P. lilfordi*, de la Isla de Dragonera, son genotipados con un conjunto de 15 microsatélites diseñados específicamente para la especie. Todos los *loci* resultan altamente polimórficos, indicando su posible uso para la reconstrucción de historias evolutivas, la asignación de subespecies o identificación de introducciones cruzadas entre islas o islotes.

Este trabajo se publica en 2011 en la revista *Conservation Genetics Resources*, que tiene un factor de impacto de 1.136, y ocupa la posición 24 en la categoría de Conservación de la Biodiversidad (41 posiciones) (*Journal Citation Reports, Web of Knowledge*).

**Polymorphic microsatellite loci for the Balearic Lizard
Podarcis lilfordi lizard (Squamata: Lacertidae)**

P. Bloor, V. Rodríguez, B. Terrasa, R.P. Brown, V. Pérez-Mellado,
J.A. Castro, A. Picornell and M.M. Ramon

Abstract

Fifteen microsatellite loci are described for the lizard *Podarcis lilfordi* from the Balearic Islands. Loci were isolated from partial genomic libraries that had been enriched for AAAG and ACAG repeat sequence. All loci were highly polymorphic (six to 19 alleles) in a sample of 26 individuals from the islet of Dragonera. Observed and expected heterozygosities ranged from 0.46 to 0.92 and 0.78 to 0.95, respectively. These loci will be used to study the evolutionary history of different forms, the occurrence of cross-islet introductions, and the significance of subspecific designations in this species.

Keywords: *Podarcis lilfordi*, microsatellite, tetranucleotide

The endangered (CITES II listed) lizard species *Podarcis lilfordi* Günther 1874 is endemic to the Balearic Islands. Natural populations are absent from the main islands of Mallorca and Menorca exist at very high densities on many of the tiny coastal rocks, islets and islands that surround them (Pérez-Mellado *et al.* 2008b). This pattern is thought to have been mediated by human activities (e.g. introduction of other species) since man first began to inhabit the islands approximately 4,000–5,000 years ago (Bover *et al.* 2008 and references therein). Size, body proportions, scalation, colour and colour pattern vary considerably between populations and have formed the basis for the description of numerous subspecies by several different authors. Approximately 25 subspecies are currently recognized (Salvador 2009a). Much of this variation seems to have originated during approximately the last 2.5 million years, and is at least partly due to cladogenesis following population isolation within different islands or regions (Brown *et al.* 2008). While attempts to determine the genetic "uniqueness" of each population using mitochondrial DNA (mtDNA) sequences have identified considerable fine-scale geographical structuring (Terrasa *et al.* 2009), a complete understanding of the significance of the intraspecific taxonomy, and the occurrence of cross-islet introductions, and the evolutionary history of the different forms have been hampered by slow mtDNA fixation rates relative to recency of population vicariance. Markers with many alleles, such as microsatellite loci, have unprecedented ability to detect and describe genetic differences between populations at much smaller geographical scales and time intervals than has traditionally been possible using mtDNA (Queller *et al.* 1993). Microsatellite loci were developed for *P. lilfordi* with the aim of examining the evolutionary history of different forms, the occurrence of cross-islet introductions, and the significance of subspecific designations for this species.

Small-insert genomic libraries were constructed from size-selected fragments (250-1500 bp) of *P. lilfordi* genomic DNA (from a single individual from the island of Dragonera) that had been digested with *Mbo*I restriction enzyme, adapter ligated and enriched for AAAG and ACAG repeat sequence (for adapter sequence see Refseth *et al.* 1997). Hybridization capture of repeat sequence, recovery of enriched DNA by polymerase chain reaction (PCR), cloning and identification of microsatellite-containing clones by colony PCR were carried out as described in Bloor *et al.* (2006). Seventy-eight AAAG positive clones (identified from 624 colonies screened) and 12 ACAG positive

clones (identified from 144 colonies screened) were sequenced on an ABI 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems; SECUGEN Sequencing Service). Fifty-three clones contained AAAG repeat sequence of 6 repeats or more and 5 clones contained ACAG repeat sequence of 6 repeats or more. Ten sequences were excluded because they corresponded to non-unique sequences.

Primer pairs were designed for 24 unique repeat-containing sequences using the program PRIMER3 (Rozen & Skaletsky 2000). All primer pairs were initially tested in single reactions. Amplifications that were consistent with polymorphic single-locus products of expected size were obtained for 15 loci (Table 1). One primer from each pair was fluorescently labelled (FAM, VIC, NED or PET) so that the corresponding PCR products could be distinguished from one another by size difference or by different fluorescent dyes (see Table 1). The sequencing of alleles revealed the presence of indels in the flanking sequence of three loci (Pli12, Pli17 and Pli21). This led to size variants that were inconsistent with the repeat unit length, and so new primers were designed to exclude these indels. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed in 10- μ L reaction volumes containing DyNAzyme 1 \times reaction buffer (Finnzymes), 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP and 0.25 U DyNAzyme II DNA *Taq* Polymerase (Finnzymes) with 0.5 μ M of each primer. Cycling conditions were 1 min at 94°C, then 34 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at locus-specific annealing temperature (see Table 1) and 45 s at 72°C with a final step of 7 min at 72°C. Fluorescently labelled PCR products were run on an ABI 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) with the GeneScan-500 (LIZ) internal size standard.

Twenty-six individuals of *P. lilfordi* from the islet of Dragonera were typed to determine levels of polymorphism. Number of alleles per locus ranged from 6 to 19. Observed and expected heterozygosities ranged from 0.46 to 0.92 and 0.78 to 0.95, respectively. Tests of deviation from Hardy-Weinberg (H-W) equilibrium revealed significant ($P < 0.05$) departures from H-W expectations at three loci (Pli6, Pli12 and Pli21) after sequential Bonferroni correction (Rice 1989) (four loci were significant at the unadjusted significance level; Pli3, Pli6, Pli12 and Pli21). Pairwise comparisons of the 15 loci did not reveal evidence of linkage disequilibrium after sequential Bonferroni

Table 1 Summary data for microsatellite loci isolated from *Podarcis lilfordi*. Polymorphism data are based on 26 individuals of *P. lilfordi* from the islet of Dragonera (see text for details).

Locus (Accession no.)	Primer sequence (5'-3')	Repeat array in clone	Size of allele (bp)	T_a (°C)	N_a	Allele size range (bp)*	H_o (H_E)	P
Pli2 (HQ453273)	GATCAGGAAGGTAAAAGTGAGG CCCCCTAAATAGTGACCCTAAG ^a	(GAAA) ₇ (GGAA) ₁₂	247	56	14	236 - 302	0.88 (0.90)	0.911
Pli3 (HQ453274)	CATGAAGGGAGGCGATGTAT GATCCCATTCTGTCTTGAA ^d	(GAAA) ₁₂	243	56	9	235 - 263	0.73 (0.80)	0.028
Pli4 (HQ453275)	TCAGTTCATGCATAAGGTCCA TTCGGCATTTCCTCAGGT ^a	(CTTT) ₁₄	382	56	19	344 - 406	0.88 (0.95)	0.396
Pli5 (HQ453276)	TGATATCCCGCTTTATCACTACC CTGACTGATACCAGAATTGTTGC ^d	(CTTT) ₁₂	383	57	10	358 - 394	0.85 (0.86)	0.336
Pli6 (HQ453277)	ACATGTTGACGGGACTGGTA CCCTGGAGGAGCTATGAATG ^c	(CTTT) ₁₁	401	56	11	380 - 420	0.46 (0.78)	0.001
Pli8 (HQ453278)	CTCTGGGAGAAATGCGTGT ^d GGTCCCTCCAGCTCTACAA	(CTTT) ₆ (CCTT)(CTTT) ₄	135	56	13	125 - 179	0.65 (0.80)	0.116
Pli9 (HQ453279)	AGCAGGCACACACAAGTAGC ^b TTGTAGGGTAAGGCCACACA	(CTTT) ₁₁	385	55.5	11	365 - 431	0.85 (0.86)	0.806
Pli10 (HQ453280)	TGACTTGTAGGGCTGGCTTT ^c AGCTGTTTCTCAGCTGTGGTC	(CTTT) ₆ (CCTT)(CTTT) ₄	252	56	12	247 - 273	0.69 (0.84)	0.167
Pli12 (HQ453281)	CAACAAAACCTTTGTAGAAGTTG GATCTTCTGGGCCCTCTCT ^b	Imperfect ¹	223	57	17	178 - 268	0.73 (0.92)	0.001
Pli16 (HQ453282)	GGGAGGTATCAGGCTGAGATT CTCCAGCAGGAAGGTAACG ^c	(CTTT) ₁₁	454	57	16	426 - 474	0.81 (0.89)	0.060
Pli17 (HQ453283)	GTAATTGCAGCCACCACACA ^d ATTTGTTGCATTTATAGTGCATTT	(GAAA) ₁₁ (GAAG) ₂	254	57	7	235 - 259	0.92 (0.82)	0.742
Pli18 (HQ453284)	CAAGAATTGAGTTTGCAGTTCC TGTCTGACAGAATGTGCTTCTC ^c	(CTTT) ₁₃	133	55	9	119 - 151	0.81 (0.87)	0.344
Pli21 (HQ453285)	CCATTATGACCTTGCTGGTG ^d GAACTCTGGTGGCCACAT	(CTTT) ₁₂	141	57	17	128 - 196	0.58 (0.93)	0.000
Pli22 (HQ453286)	TGCCTTTATAGCCACCCATAC CCATATCTGCCCATCTGGTT ^d	(CTGT) ₆	110	55	6	107 - 123	0.65 (0.71)	0.888
Pli24 (HQ453287)	CCACAAGGACTCAGGCTCTC TCCCCACTTAAGCATGTTC ^b	(CTGT) ₇	113	55	10	104 - 136	0.88 (0.87)	0.968

P values (P) are given for tests of deviation from Hardy-Weinberg (H-W) equilibrium. Significant tests of deviation from H-W equilibrium after sequential Bonferroni correction are given in bold typeface. T_a annealing temperature (°C), N_a , number of alleles. H_E and H_o correspond to expected and observed heterozygosities, respectively.

^a 6-FAM-labelled primer, ^b PET-labelled primer, ^c NED-labelled primer or ^d VIC-labelled primer.

*Based on the GeneScan-500 (LIZ) internal size standard run on an ABI 3130 DNA Sequencer; 5' ends of unlabelled primers were modified by addition of the sequence GTTCTT to provide conditions for essentially full terminal nucleotide addition (see Brownstein *et al.* 1996), with the exception of loci Pli12, Pli17 and Pli21. ¹(GAAA)₁₃(GAAAAGAA)₂(GAAA).

correction (seven of 105 tests were significant at the unadjusted significance level). All calculations were performed using the program GENEPOP version 3.4 (Raymond & Rousset 1995). The levels of polymorphism uncovered at these loci suggest that they should be useful for the study population differentiation as well as the evolutionary histories of the different morphological forms present in this species.

Acknowledgments

This work was financed by the research grants CGL2006–10893-C02 and CGL2009-2926-C02 of the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología and European Union FEDER grants. V.R. was supported by a grant from Direcció General R + D+ I (Govern de les Illes Balears).

Análisis preliminar de 15 microsatélites en *Podarcis lilfordi*

Cuarenta y siete especímenes de 14 localidades de *P. lilfordi*, estudiados previamente mediante marcadores mitocondriales (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009), se seleccionan para analizar el conjunto de *loci* microsatélite diseñado por Bloor *et al.* (2011). En este análisis preliminar se incluyen individuos de las islas e islotes: i) Es Colomer y Toro, como islas próximas a Mallorca, ii) Aire, Porrassa, Addaia gran, Addaia petita y los dos Condrell, contiguas a Menorca y iii) Estell Xapat, Estell de fora, Conillera, Foradada y dos localidades de Cabrera (faro y puerto), del Archipiélago de Cabrera.

La amplificación de microsatélites, su análisis y posterior interpretación, así como los análisis de agrupamiento, se realizan siguiendo las condiciones y metodología descritas en Rodríguez *et al.* (2013) (véase también apartado de material y métodos de esta tesis).

Tabla 1. Diversidad genética observada en *P. lilfordi* para 15 STRs.

<i>Locus</i>	Num. alelos	Rango alélico	Het. Obs.	Het. Esp.	M
Pli2	21	228–310	0.804	0.915	0.253
Pli3	15	225–269	0.447	0.869	0.333
Pli4	25	354–416	0.717	0.923	0.397
Pli5	13	358–402	0.702	0.885	0.289
Pli6	22	370–422	0.733	0.878	0.415
Pli8	15	131–187	0.625	0.846	0.263
Pli9	14	371–411	0.511	0.845	0.341
Pli10	13	251–283	0.674	0.842	0.394
Pli12	26	164–262	0.860	0.937	0.263
Pli16	17	402–472	0.395	0.922	0.239
Pli17	14	229–275	0.756	0.854	0.298
Pli18	13	109–155	0.766	0.893	0.277
Pli21	16	118–188	0.667	0.889	0.225
Pli22	9	103–127	0.489	0.760	0.360
Pli24	13	102–152	0.750	0.864	0.255

M: estadístico Garza & Williamson (2001)

En la tabla 1 se detallan los parámetros de diversidad observados en las muestras analizadas en este análisis preliminar. Mientras que en la tabla 2, se especifica el número de alelos y su rango a nivel de especie, al añadir los genotipos previamente obtenidos en Bloor *et al.* (2011), del islote de Dragonera.

El número de alelos a nivel de especie oscila entre 9 (Pli22) y 29 (Pli12), con una media de 17.5 alelos por *locus*, mostrando un alto nivel de polimorfismo.

Análisis de agrupamiento (K 1 a 10, 20 réplicas, 200.000 genealogías MCMC, 200.000 generaciones descartadas como *burn-in* con un modelo de mezcla y frecuencias correlacionadas) en los que también se incluyen las muestras del islote de Dragonera analizadas previamente en Bloor *et al.* (2011), evidencian dos grupos

principales (Fig. 1; $\Delta K = 7.132$): uno en el que se incluyen las muestras de Toro, en Mallorca, y los dos Condrell, en Menorca (Clado I), y otro grupo que contiene el resto de islas e islotes (Clado II). El segundo valor más probable inferido por el estadístico ΔK corresponde a $k=4$. Se requieren análisis con un mayor número de muestras para establecer conclusiones.

Tabla 2. Número de alelos y rango alélico para *P. lilfordi*.

<i>Locus</i>	Num. alelos	Rango alélico
Pli2	24	228–310
Pli3	17	225–267
Pli4	28	344–416
Pli5	13	358–402
Pli6	23	370–422
Pli8	19	125–187
Pli9	19	365–431
Pli10	15	247–283
Pli12	29	164–268
Pli16	24	402–480
Pli17	14	229–275
Pli18	14	109–155
Pli21	19	118–196
Pli22	9	103–127
Pli24	14	102–152

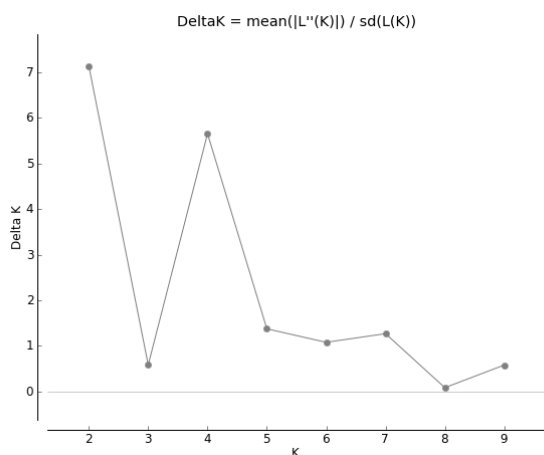


Figura 1. Variación del estadístico ΔK , que infiere el número de *clusters* genéticos, asignando un valor probable de $K=2$.

***Multilocus genetic diversity and historical biogeography
of the endemic wall lizard from Ibiza and Formentera,
Podarcis pityusensis (Squamata: Lacertidae)***
(Rodríguez *et al.*
2013)

Setenta y cuatro especímenes de *P. pityusensis*, de 37 localidades (cubriendo 22 de las 23 especies reconocidas), se analizan con cinco fragmentos mitocondriales y 15 microsátélites. Los resultados muestran una baja diversidad genética dentro de la especie, e identifican dos linajes principales, con ciertas discordancias en función del marcador utilizado, en general: uno incluye individuos de i) las islas o islotes adyacentes a Ibiza, y otro a los de ii) Formentera y las islas de Es Freus. Individuos de la isla principal de Ibiza se agrupan con el linaje i) al analizar marcadores nucleares, y con el ii) al analizar datos mitocondriales. El tiempo de divergencia entre ambos linajes también varía en función del marcador investigado: 295–111 Ka, sólo con ADNmt, 221–89 Ka, combinando ambos marcadores.

Este trabajo está publicado en *Molecular Ecology*, revista que ocupa la sexta posición (de 46), en el ranking de la categoría Biología Evolutiva, con un factor de impacto en los últimos 5 años de 6.543 (*Journal Citation Reports, Web of Knowledge*).

**Multilocus genetic diversity and historical biogeography of the
endemic wall lizard from Ibiza and Formentera,
Podarcis pityusensis (Squamata: Lacertidae)**

V. Rodríguez, R.P. Brown, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado,
J.A. Castro, A. Picornell, M.M. Ramon

Abstract

Two monophyletic sister species of wall lizards inhabit the two main groups of Balearic Islands: *Podarcis lilfordi* from islets and small islands around Mallorca and Menorca and *Podarcis pityusensis* from Ibiza, Formentera and associated islets. Genetic diversity within the endangered *P. lilfordi* has been well characterized, but *P. pityusensis* has not been studied in depth. Here, 2430 bp of mtDNA and 15 microsatellite loci were analysed from *P. pityusensis* populations from across its natural range. Two main genetic groupings were identified, although geographical structuring differed slightly between the mtDNA and the nuclear loci. In general, individuals from islets/islands adjacent to the main island of Ibiza were genetically distinct from those from Formentera and the associated Freus islands for both mtDNA and the nuclear loci. However, most individuals from the island of Ibiza were grouped with neighbouring islets/islands for nuclear loci but with Formentera and Freus islands for the mitochondrial locus. A time-calibrated Bayesian tree was constructed for the principal mitochondrial lineages within the Balearics, using the multispecies coalescent model, and provided statistical support for divergence of the two main *P. pityusensis* lineages 0.111–0.295 Ma. This suggests a mid-late Pleistocene intraspecific divergence, compared with an early Pleistocene divergence in *P. lilfordi*, and postdates some major increases in sea-level between 0.4–0.6 Ma, which may have flooded Formentera. The program IMA2 provided a posterior divergence time of 0.089–0.221 Ma, which was similar to the multispecies coalescent tree estimate. More significantly, it indicated low but asymmetric effective gene copy migration rates, with higher migration from Formentera to Ibiza populations. Our findings suggest that much of the present-day diversity may have originated from a late Pleistocene colonization of one island group from the other, followed by allopatric divergence of these populations. Subsequent gene flow between these insular groups seems likely to be explained by recent human introductions. Two evolutionary significant units can be defined for *P. pityusensis* but these units would need to exclude the populations that have been the subjects of recent admixture.

Key-words: divergence time, evolutionary significant units, *Podarcis*, multispecies coalescent, isolation-with-migration, Balearic Islands

Introduction

Coalescent theory has led to the development of statistical methods that enable key population parameters to be estimated. Application of these methods to sequence or length polymorphism data is popular because they can provide insights into population demographics and genetic structures, and help our understanding of causes of intraspecific diversity (Hey 2005; Rocha *et al.* 2011; Brown *et al.* 2012; Zieliński *et al.* 2013). They are also useful in conservation genetics, where population sizes and migration between populations with resultant changes in genetic structuring are key factors that could affect the long term survival of conservation units (Paquette *et al.* 2007; Sly *et al.* 2010; Karl *et al.* 2011; Schoville *et al.* 2011; Reilly *et al.* 2012). The timing of intraspecific splitting events is also important, because the time periods over which populations have followed independent trajectories are informative when attempting to assess whether populations merit evolutionary significant or management unit status.

Identification of suitable molecular markers is critical for informative coalescent-based inferences. Low substitution rates of nuclear sequences mean that they often contain relatively little information about recent population-level processes. In contrast, nuclear microsatellite markers have 100–1000 times higher evolutionary rates and are therefore more revealing about both recent historical and contemporary genetic patterns (Gilbert *et al.* 1990; Wan *et al.* 2004), but tend to be less suitable for examining earlier periods in a species' history. Despite some well-known drawbacks (Zhang & Hewitt 2003), the relatively high substitution rate of mtDNA (5–10 times that of nuclear sequences; Ballard & Whitlock 2004; Wan *et al.* 2004) make it very useful for examining events that occurred during earlier periods of a typical species history. MtDNA is therefore quite a suitable marker for population and conservation genetics (Wan *et al.* 2004). This study employs microsatellite and mtDNA markers to examine populations of an island endemic lizard that appear to have originated just over 5 Ma, based on the rationale that they should be informative about very recent/current processes and older events in the species history, respectively.

Podarcis pityusensis (Boscà 1883) is found in the western Balearic Islands known as the Pityusic group. More specifically, it inhabits Ibiza and Formentera, along with 42 of their associated islets (Pérez-Mellado 2009; Salvador 2009b). It is classified as “near

threatened” by the IUCN, unlike its sister species from the more eastern Balearic Islands (Gymnesic group), *P. lilfordi*, which is classified as “endangered”. *Podarcis pityusensis* shows considerable phenotypic variation among populations, in terms of size, sexual dimorphism, dorsal scales and coloration, which has led to the recognition of 23 subspecies (Salvador & Pleguezuelos 2002; Pérez-Mellado 2009). To date, there have been no detailed analyses of genetic diversity within this species. Isozyme markers were compared between subspecies by Guillaume & Cirer (1985), while Terrasa *et al.* (2004) examined mtDNA. Both studies detected low levels of diversity. Brown *et al.* (2008) included *P. pityusensis* from five sites in their mtDNA analysis of both Balearic *Podarcis*. Although this limited sampling captured the main mtDNA lineages it was likely to represent only a small proportion of the total cross-archipelago diversity.

Some of the geographical events that might have impacted on the population history of Balearic *Podarcis* are well known. The Messinian Salinity Crisis (MSC) is a key event that includes the isolation and deep desiccation of the Mediterranean, and had an impact on many Mediterranean islands taxa (Bover *et al.* 2008; Cano-Maqueda *et al.* 2008; Bauza-Ribot *et al.* 2011; Bidegaray-Batista & Arnedo 2011). After a long period of desiccation 5.96 Ma to 5.33 Ma ago (Krijgsman *et al.* 1999; Duggen *et al.* 2003), the Mediterranean Basin refilled within a very short time, possibly only a few months (Garcia-Castellanos *et al.* 2009). There is strong evidence to suggest that *P. pityusensis* became isolated from *P. lilfordi* at this time (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009), so intraspecific lineages are expected to postdate the beginning of the Pliocene. MtDNA analysis of Balearic *Podarcis* dated the earliest sequence divergence among *P. lilfordi* at 1.45–3.99 Ma and the earliest divergence among *P. pityusensis* at 0.18–2.29 Ma (Brown *et al.* 2008). This predicts lower genetic diversity in *P. pityusensis* that could be explained by greater historical connections among populations: shallow channels (often < 50 m) separate the main Pityusic islands of Formentera and Ibiza and their associated islets, and these will have been exposed during periods of low sea-levels, as would have occurred during glacial maxima. Another crucial geological feature of the islands is that Formentera is mostly low and flat (although it does presently rise to a peak of 197 m), unlike Ibiza which reaches nearly 500 m. Major historical flooding during warmer interglacials, particularly Marine Isotope Stage 11 (~0.4 Ma ago), may also have led to the extinction of lineages confined to low-lying islands.

Knowledge of the genetic diversity within *P. pityusensis* is in part motivated by a political will to develop conservation strategies for the Balearic Islands endemic lizards. It will also contribute to our understanding of the historical biogeography of the Mediterranean. The species is subject to local (Balearic Islands Government) and international (CITES Appendix II) levels of protection which do not distinguish among the different island populations. Any refinement of existing legislation and/or conservation strategies therefore requires more detailed knowledge of genetic structuring.

We aimed to provide the first detailed analysis of nuclear and mtDNA genetic diversity in *P. pityusensis* from across the Pityusic archipelago. The primary objectives were to establish the robustness of previously-highlighted mtDNA lineages and establish whether these were also reflected in nuclear genealogies, determine the origin of these putative intraspecific units and assess the genetic evidence for their long-term persistence by examining effective population sizes and levels of migration between them.

Methods

Samples and DNA isolation

Seventy-four *P. pityusensis* were captured by noose at 37 sites (1–5 individuals per site) (Fig. 1, Table 1), under license from the Balearic Islands Government (permit: CAP09/2010 from Conselleria de Medi Ambient). Islets with a documented history of introductions from populations from other islets were excluded (Böhme & Eisentraut 1981). The samples covered 22 of the 23 recognized subspecies. Tail tips were removed and stored in 100% ethanol. All individuals were released at the site of capture. Genomic DNA was extracted from the tissue samples using standard phenol-chloroform protocols.

Microsatellite loci

Fifteen microsatellites were analysed, with all having been identified and tested in the sister species, *P. lilfordi* (Bloor *et al.* 2011). PCRs were run in a GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using primers and conditions described in Bloor *et al.* (2011). Fluorescently labelled PCR products were run on an ABI 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with GeneScan-500 (LIZ) internal size standard. Fragment length was

assigned using GeneMapper software v3.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

General statistics of microsatellite diversity were obtained using Arlequin ver.3.1.1 (Excoffier *et al.* 2005). Analyses of molecular variance (AMOVA) were also carried out using this program in order to test the statistical significance of genetic structure between the two main geographic groups (Formentera and adjacent Freus islands versus Ibiza and associated islands; see Fig. 1). Genetic structure was inferred with a model-based clustering method implemented in the program STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000), using an admixture model with correlated allele frequencies among populations. Twenty STRUCTURE runs (chain length=200000 steps, burn-in=200000 steps) were performed for all K between 1 and 20. The number of distinct genetic clusters was determined through assessment of ΔK (Evanno *et al.* 2005) using STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012). STRUCTURE and CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) were then used to assign individuals to clusters using the membership coefficient, Q . A threshold value of $Q=0.2$ was used, because it is efficient and accurate at differentiating between purebreds and hybrids (Vähä & Primmer 2006), with Q values around 0.2-0.8 being indicative of hybridization between individuals from different clusters.

Mitochondrial DNA

Five mtDNA fragments were amplified to provide partial gene sequences from the following regions: 12S rRNA, cytochrome *b* (two separate regions), the control region, ND1 and ND2 and four tRNAs (tRNA_{Thr}, tRNA_{Ile}, tRNA_{Gln}, and tRNA_{Met}). Primers and amplification conditions are the same as those previously used for *P. lilfordi* (Terrasa *et al.* 2009). Both heavy and light strands were sequenced on an automated ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using BigDye® Terminator v 3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The following homologous sequences were also obtained from previous studies: five *P. pityusensis* (Genbank accessions: EF694768–69, EF694794–95, EU006725–26, EF694814–16, EF990552, EF694827–28) and ten *P. lilfordi* (Genbank accession numbers: EF694760–62, EF694764–66, EF694771, EF694773–75, EF694782, EF694785, EF694787–88, EF694799, EU006728, EU006730, EU006734, EU006738, EU006743, EU006745,

EU006753, EU006756, EF694797, EF694799, EF694802, EF694805, EF694807, EF694809–10, EF990517, EF990522, EF990525, EF990531, EF990536, EF990540–41, EF990545–46, KC623944). Sequences were aligned using BioEdit Sequence Alignment Editor ver.7.0.5.2 (Hall 1999).

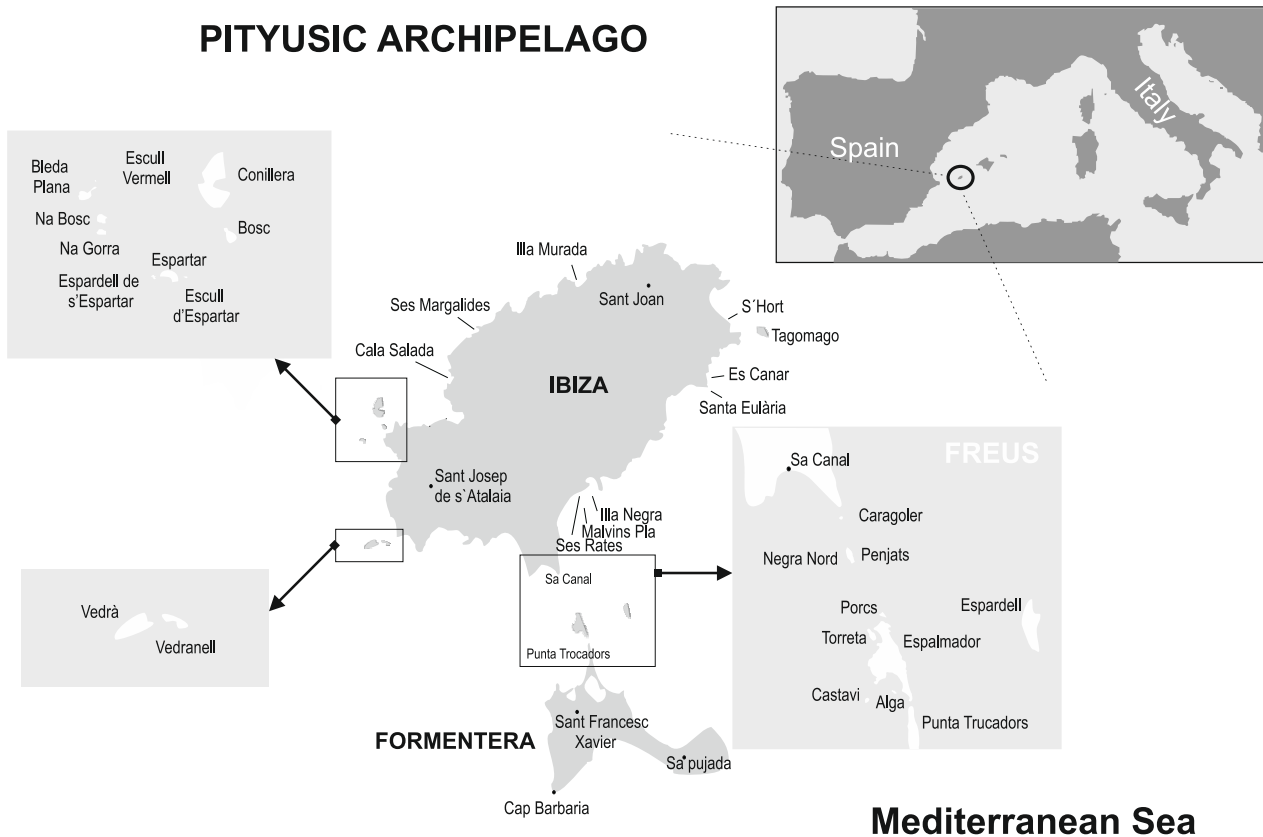


Figure 1. Distribution of localities sampled in *Podarcis pityusensis*. Seventy three specimens from 37 localities were analyzed.

Estimation of genetic diversity and tests of neutrality were carried out using DnaSP ver.5.10.01 (Librado & Rozas 2009). Statistical significance of geographical structuring was examined in the same way as for the microsatellites, i.e., using analysis of molecular variance (AMOVA) on the same geographical groupings. The Bayesian method in BAPS v.5.3 (Corander *et al.* 2003) was used to infer population structure. Genetic mixture analyses were performed with an upper bound of $K=40$ (no priors on geographic location were used). The number of clusters was determined and then admixture analyses were executed to infer the ancestral source of the samples.

Table 1: Localities sampled, recognized subspecies and number of specimens analysed (*n*).

Id	<i>n</i>	Localities	Subspecies
Formentera Island			
Ft	5	Punta Trocadors	<i>P. p. formenterae</i>
Fx	4	Sant Francesc Xavier	<i>P. p. formenterae</i>
Be	1	Cap Barbaria	<i>P. p. formenterae</i>
Sp	1	Sa Pujada	<i>P. p. formenterae</i>
Freus islands			
Er	4	Espalmador	<i>P. p. formenterae</i>
El	3	Espardell	<i>P. p. formenterae</i>
Al	3	Alga	<i>P. p. formenterae</i>
G	3	Castaví	<i>P. p. gastabiensis</i>
Nn	4	Negra Nord	<i>P. p. negrae</i>
P	3	Porcs	<i>P. p. formenterae</i>
Ip	3	Penjats	<i>P. p. ahorcadosi</i>
Cg	3	Caragoler	<i>P. p. caragolensis</i>
Tr	3	Torreta	<i>P. p. torretensis</i>
Ibiza Island			
E	5	Sant Joan	<i>P. p. pityusensis</i>
At	1	Sant Josep de s'Atalaia	<i>P. p. pityusensis</i>
Sc	3	Sa Canal	<i>P. p. pityusensis</i>
Islands surrounding Ibiza			
In	3	Illa Negra	<i>P. p. pityusensis</i>
Bc	1	Bosc	<i>P. p. pityusensis</i>
Cn	1	Conillera	<i>P. p. carlkochi</i>
Vd	1	Vedranell	<i>P. p. vedrae</i>
V	1	Vedrà	<i>P. p. vedrae</i>
Ee	1	Espardell de s'Espartar	<i>P. p. frailensis</i>
Ep	2	Espartar	<i>P. p. kameriana</i>
Ed	1	Escull d'Espartar	<i>P. p. kameriana</i>
Ev	1	Escull Vermell	<i>P. p. maluquerorum</i>
Bp	1	Bleda Plana	<i>P. p. maluquerorum</i>
Ng	1	Na Gorra	<i>P. p. gorrae</i>
Nb	1	Na Bosc	<i>P. p. gorrae</i>
Im	2	Illa Murada	<i>P. p. muradae</i>
Ma	1	Malvins Pla	<i>P. p. schereitmuelleri</i>
Cs	1	Cala Salada	<i>P. p. calaesaladae</i>
Se	1	Santa Eulària	<i>P. p. redonae</i>
Sh	1	S'Hort	<i>P. p. hortae</i>
Sr	1	Ses Rates	<i>P. p. ratae</i>
Ea	1	Es Canar	<i>P. p. canensis</i>
Ms	1	Ses Margalides	<i>P. p. hedwigkamerae</i>
Tg	1	Tagomago	<i>P. p. tagomagensis</i>

*BEAST v.1.7.4 was used to infer the phylogenetic relationships and divergence times between the main Balearic *Podarcis* populations using the multispecies coalescent approach (Heled & Drummond 2010; Drummond *et al.* 2012). Nuclear microsatellites can not be used in this analysis and so the mitochondrial sequence alone was used. The method has the advantage of estimating divergence times while taking into account within-population ancestral polymorphism (of mtDNA in this case). In this application, we use genetically divergent potentially non-interbreeding *Podarcis* populations, rather than recognized species and so will use the term “population tree”, rather than the more widely-applied “species tree”. The populations corresponded to two genetic groups of *P. pityusensis* that were detected here and five *P. lilfordi* lineages detected by previous studies (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009). The age of the (*P. lilfordi*, *P. pityusensis*) node on the population tree was constrained using the Normal distribution $N(5.325, 0.0001)$, where 1 unit = 1Ma. There is good evidence to suggest that rising sea-levels separated the Gymnesic and Pityusic Islands groups at the end of the Messinian salinity crisis (Krijgsman *et al.* 1999; Duggen *et al.* 2003). Also, the degree of divergence in mitochondrial genes that have been well-characterised in other reptiles strongly supports separation of these groups at this time (Brown *et al.* 2008). The time of the most recent common ancestor (MRCA) of all *P. pityusensis* was loosely constrained using the Gamma distribution $G(5.8, 0.2)$ and the MRCA of *P. lilfordi* was loosely constrained using $G(3.48, 0.5)$. MtDNA sequence was assigned to eight partitions which are defined as: 12S rRNA, control region, all tRNAs, ND1/ND2 1st + 2nd codon position, ND1/ND2 3rd codon position and a single partition for each codon position within the cytochrome b sequence. Evolutionary models were tested using AICc (Akaike Information Criterion corrected for small samples) and for each partition, using MrAIC v 1.4.4 (Nylander 2004). If the selected model was not available in *BEAST, then the most similar more complex model was used instead.

The *BEAST MCMC sampler was run for 400 million generations, with one step per 10000 being sampled. A strict clock model was specified (see Brown & Yang 2011) and a Yule speciation process used for the tree prior. Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond 2007) was used to analyse the trace files generated by Bayesian MCMC runs, to check for convergence. Posterior trees were combined to obtain a tree with a maximum sum of posterior clade probabilities (for both population and gene trees).

Historical biogeography and demography

We applied the isolation-with-migration model (Nielsen & Wakeley 2001), implemented in IMA2 (Hey 2010a, b), to explore other aspects of population history using the entire mtDNA sequence and 15 microsatellite loci. This coalescent-based MCMC approach was applied to the two main islands groups (Ibiza and Formentera, each with their associated islands) in order to examine migration of gene copies between these groups after splitting. The Hasegawa-Kishino-Yano mutation model (HKY) (Hasegawa *et al.* 1985) was used for the mtDNA, while the stepwise mutation model (SMM) (Kimura & Ohta 1978) was used for the microsatellites. We specified uniform priors for divergence time, population size and migration rates. A geometric heating model, with 40 independent heated chains, was found to provide good mixing, and high repeatability between the first and second halves of the run, and between analyses that began from different starting positions. After exploratory runs, we ran the MCMC chain for 5×10^6 steps, but discarded the first 5×10^5 steps as burn-in. Conversion of parameters to real time was achieved using a mutation rate of 6.075×10^{-3} mutations per site per Ma, from previous estimates for this mtDNA fragment (Brown *et al.* 2008), and a generation time of 2.09 years (Galán 1999).

Results

Microsatellite variability and population structure

Sixty nine *P. pityusensis* were genotyped for all 15 microsatellites. Numbers of alleles per locus ranged from 9 (Pli22 or Pli24) to 25 (Pli4), with a mean of 15.7 (Table S1, supporting information). Observed heterozygosity was generally lower than expected heterozygosity for most loci, which is indicative of genetic structuring (Table S1). Low values for the statistic the Garza & Williamson test ($M = 0.160\text{--}0.371$) was indicative of recent size reductions (Garza & Williamson 2001).

Most variation was found among individuals within Formentera and Ibiza regions (97.6%) as opposed to between them (2.4%) ($F_{ST} = 0.024$; $P < 0.001$). We also assessed an additional level of subdivision using AMOVA, with the regions divided into groups, i.e., Ibiza divided into the Ibiza main island plus associated islands, and Formentera divided into the Formentera main island plus islets in the channel between Ibiza and Formentera

(Freus islands). This indicated 1.5% variation between the Ibiza and Formentera regions, 1.5% between groups within regions and 97% within populations.

Table S1. Genetic variability for microsatellite loci in *P. pityusensis*. Names of loci correspond to Bloor *et al.* (2011).

Locus	Num. alleles	Allelic range	Obs. Het.	Exp. Het.	M
Pli2	24	212–302	0.879	0.939	0.264
Pli3	11	225–271	0.809	0.815	0.234
Pli4	25	312–406	0.696	0.942	0.263
Pli5	13	358–398	0.681	0.815	0.371
Pli6	21	362–422	0.750	0.912	0.344
Pli8	15	113–179	0.758	0.867	0.246
Pli9	13	355–435	0.435	0.851	0.160
Pli10	17	247–295	0.672	0.881	0.347
Pli12	18	168–268	0.855	0.836	0.207
Pli16	18	414–480	0.574	0.907	0.269
Pli17	10	233–269	0.652	0.850	0.270
Pli18	18	113–175	0.806	0.910	0.305
Pli21	15	114–208	0.721	0.880	0.165
Pli22	9	107–137	0.338	0.454	0.310
Pli24	9	104–140	0.813	0.800	0.310

M: Garza & Williamson statistic (2001)

Analysis of ΔK (Evanno *et al.* 2005) estimated by STRUCTURE and STRUCTURE HARVESTER indicated two genetically distinct clusters (highest value of $\Delta K=11.325$) (Fig. 2A). $K = 4$ presented the second highest ΔK value ($\Delta K=3.961$). In general, groups are associated with geographic locations: one of them (cluster I) was found in Formentera and the associated Freus islands, with six individuals presenting slightly lower membership coefficients (ranging from 0.50 to 0.80). The second cluster (cluster II) contains populations from the main island of Ibiza and associated islets but also included nine admixed individuals, with Q ranging from 0.61-0.98, some of them belonging to the same localities poorly assigned to cluster I. Individuals from Ibiza were unequivocally assigned to cluster II ($Q>0.9$), with three exceptions: two individuals with slightly lower values of Q (Malvins Pla: $Q = 0.76$ and Illa Murada: $Q = 0.87$), and one of three individuals from Sa Canal (a peninsula sited in southern Ibiza, very close to Freus islands) ($Q = 0.09$) being assigned to cluster I.

MtDNA diversity and population structure

The five mitochondrial fragments were sequenced for 73 individuals (sequences have been deposited in GenBank: accession numbers JX852045-JX852108 and JX852118-JX852137) to provide a total concatenated fragment length of 2430 bp (cytochrome b, 831 bp; 12S rRNA, 373 bp; ND1, 59 bp; ND2, 415 bp; tRNAs, 271 bp; control region 481 bp). Sixty different haplotypes were detected within *P. pityusensis*, which differed by a mean (uncorrected) pairwise difference of 9.1, and contained 90 polymorphic sites. All diversity indices estimated in *P. pityusensis* were lower than corresponding values for *P. lilfordi* (Table 2).

The genetic structure was assessed by AMOVA, which estimated the variance partitions as 39.4% between the Ibiza and Formentera regions and 60.6% within these regions ($F_{ST}=0.394$; $P<0.001$). Assessment of an additional subdivision of geographic populations (Ibiza: Ibiza island vs. associated islands; Formentera: Formentera island vs. Freus islands) partitioned the variance as 30.8% between Formentera and Ibiza regions, 14.5% among groups within regions and 54.7% within populations.

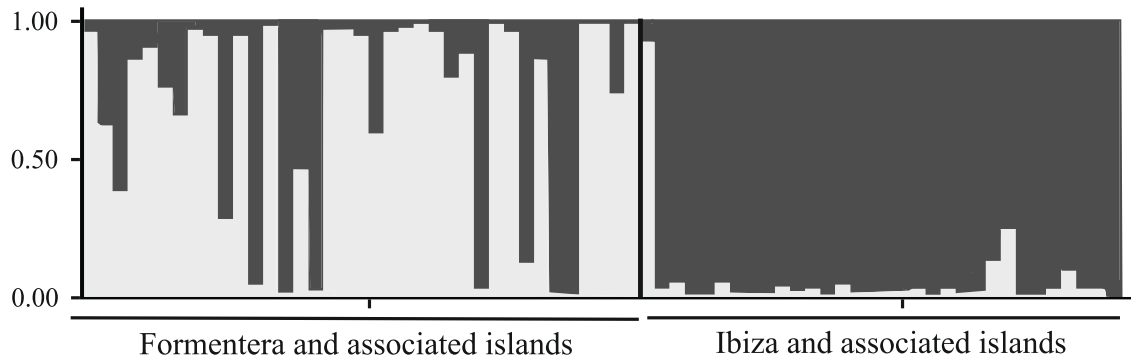
The BAPS analysis of the mtDNA locus defined two genetic clusters ($\ln L=-1664.367$) (Fig. 2B). The first cluster (A) included sites from Formentera, Freus islands, Ibiza main island, as well as from some of the Ibizan islands and islets (Es Canar, Cala Salada, Na Gorra, Vedranell and Vedrà). Ibiza main island showed considerable diversity, with two samples (from one site) assigned to the second cluster (B). This second cluster contained the majority of islands and islets associated with Ibiza, i.e., Espartar and surrounding islets (Escull d'Espartar and Espardell de s'Espartar), Bosc, Na Bosc, Bleda Plana, Escull Vermell, Conillera, Illa Murada and Ses Margalides to the north of Ibiza; s'Hort and Tagomago in the east; and Ses Rates, Illa Negra and Malvins Pla in the south (see Fig. 1).

Species phylogeny and divergence times

Strong posterior support ($P=1.00$) was obtained for the basal Balearic Islands *Podarcis* nodes that corresponded to the MRCAs of the recognized species *P. lilfordi* and *P. pityusensis*. The mean posterior divergence time between the two *P. pityusensis*

“species” was 0.178 Ma (95% highest posterior density (HPD): 0.111–0.295 Ma) (Fig. 3). The ancestral species node for *P. lilfordi* was dated at 1.878 Ma (95% HPD: 0.899–2.948 Ma) (Fig. 3). The mitochondrial DNA tree for *P. pityusensis* is shown in Fig. 4.

A) Microsatellite data



B) Mitochondrial data

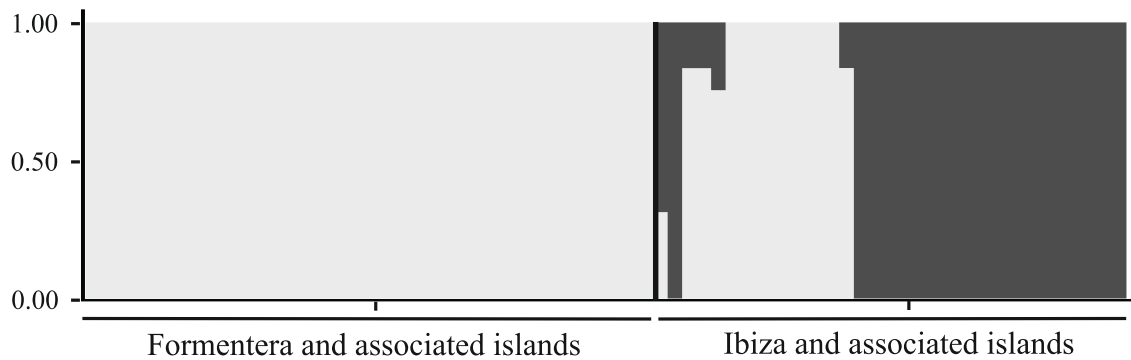


Figure 2. Genetic structure inferred from microsatellites and mtDNA for the two main geographic regions used in this study. A) Microsatellite-based Bayesian assignments identified two main groups (cluster I: light grey and cluster II: dark grey). The bar plot shows estimated membership coefficient (Q); vertical bars represent individuals and assignment probabilities. B) Mixture analyses, for mitochondrial data, estimated by BAPS software identified two clusters (cluster A: light grey and cluster B: dark grey). In the Bar plot, vertical bars represent individuals and proportions of admixture, with different colours corresponding to different ancestral sources.

Table 2. Indices of diversity for the concatenated mtDNA fragment in *P. pityusensis*, compared with *P. lilfordi*.

Species	N°	V	ti/tv	A+T (%)	N° hap	Nucleotide diversity	Mean pairwise differences	Haplotype diversity	Fu's Fs (1997)	Fu & Li's D (1993)	Fu & Li's F (1993)	Fay & Wu's H (2000)	Tajima's D (1989)
<i>P. lilfordi</i> ■ (2382 bp)	117	189	4.52	61.3	62	0.019±0.005	45.067±19.503	0.979±0.005	-1.129 ^{ns}	0.652 ^{ns}	0.860 ^{ns}	-17.572 ^{ns}	0.770 ^{ns}
<i>P. pityusensis</i> (2430 bp)	73	90	3.20	61.1	60	0.004±0.001	9.083±4.17	0.992±0.004	-56.983***	-2.432**	-2.589**	-25.341**	-1.745*

N°, number of individuals sampled; V, variable position; N° hap, number of haplotypes; ^{ns} not significant; *P<0.1; ** P<0.05; ***P<0.001.

■ obtained from data in Terrasa *et al.* 2009

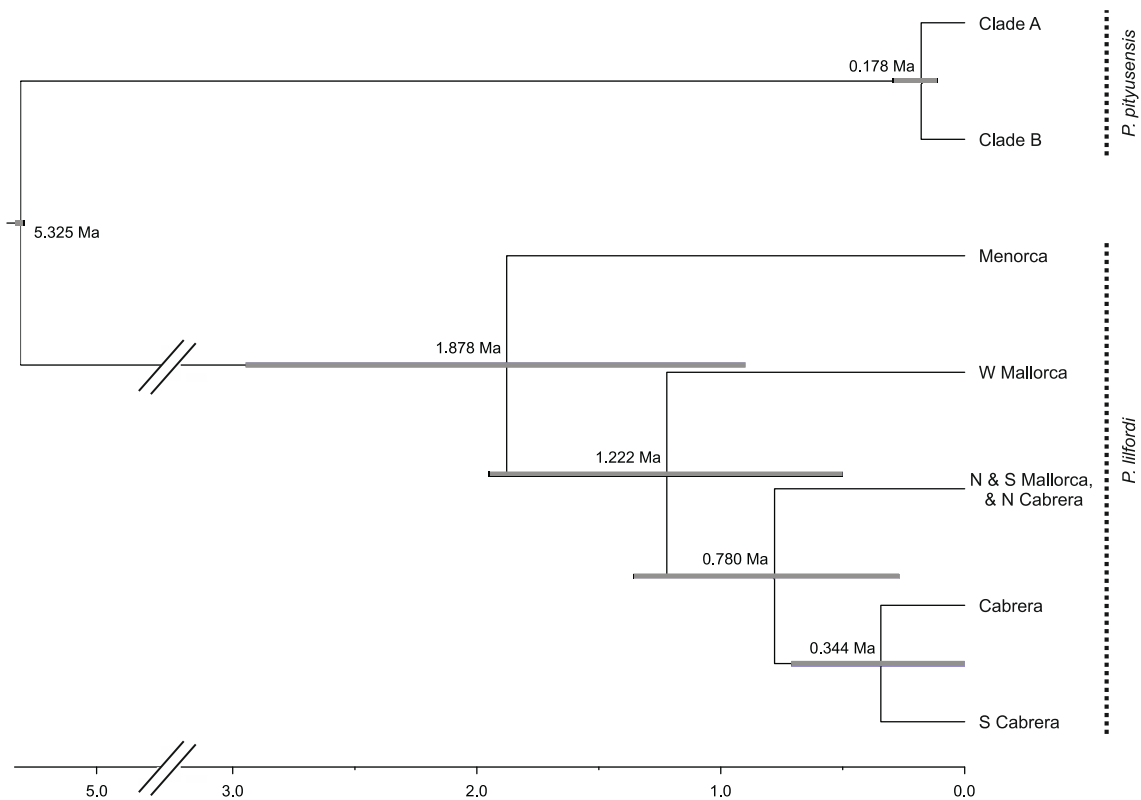


Figure 3. Population tree chronogram estimated by *BEAST. *P. pityusensis* populations corresponded to clusters detected by BAPS analysis (Fig. 2B), and *P. lilfordi* populations correspond to mitochondrial clades identified by Brown *et al.* (2008). Grey bars correspond to the 95% highest posterior density intervals for each population divergence time.

Historical biogeography and demography

IMa2 provided informative posteriors for all parameters (Fig. 5). Replicated analyses that started from different positions converged on the same posterior. The posterior mean of t was 0.6697 (95% HPD: 0.3955–0.9765). Conversion into time in years suggests that Ibiza and associated islands diverged from the remaining Pityusic populations about 0.151 Ma (95% HPD: 0.089–0.221 Ma). Effective population sizes were approximately six times higher in Ibiza and associated islands (4.23×10^6 ; 95% HPD: 1.29×10^6 – 8.86×10^6) than in Formentera and Freus islands (6.47×10^5 ; 95% HPD: 3.31×10^5 – 9.93×10^5), with a size more similar to the ancestral population (4.36×10^5 ; 95% HPD: 2.50×10^5 – 6.28×10^5). Estimated effective number of migrant gene copies per generation (2NM) was higher from the Formentera group to the Ibizan group (7.19; 95% HPD: 0–22.33), than in the opposite direction (1.43; 95% HPD: 0–4.45).

Figure 4. Mitochondrial phylogenetic tree estimated by *BEAST, showing relationships among *P. pityusensis* haplotypes. Principal clusters (A, B), geographical localization of each specimen and Bayesian posterior probabilities (> 0.9) are indicated on the tree.

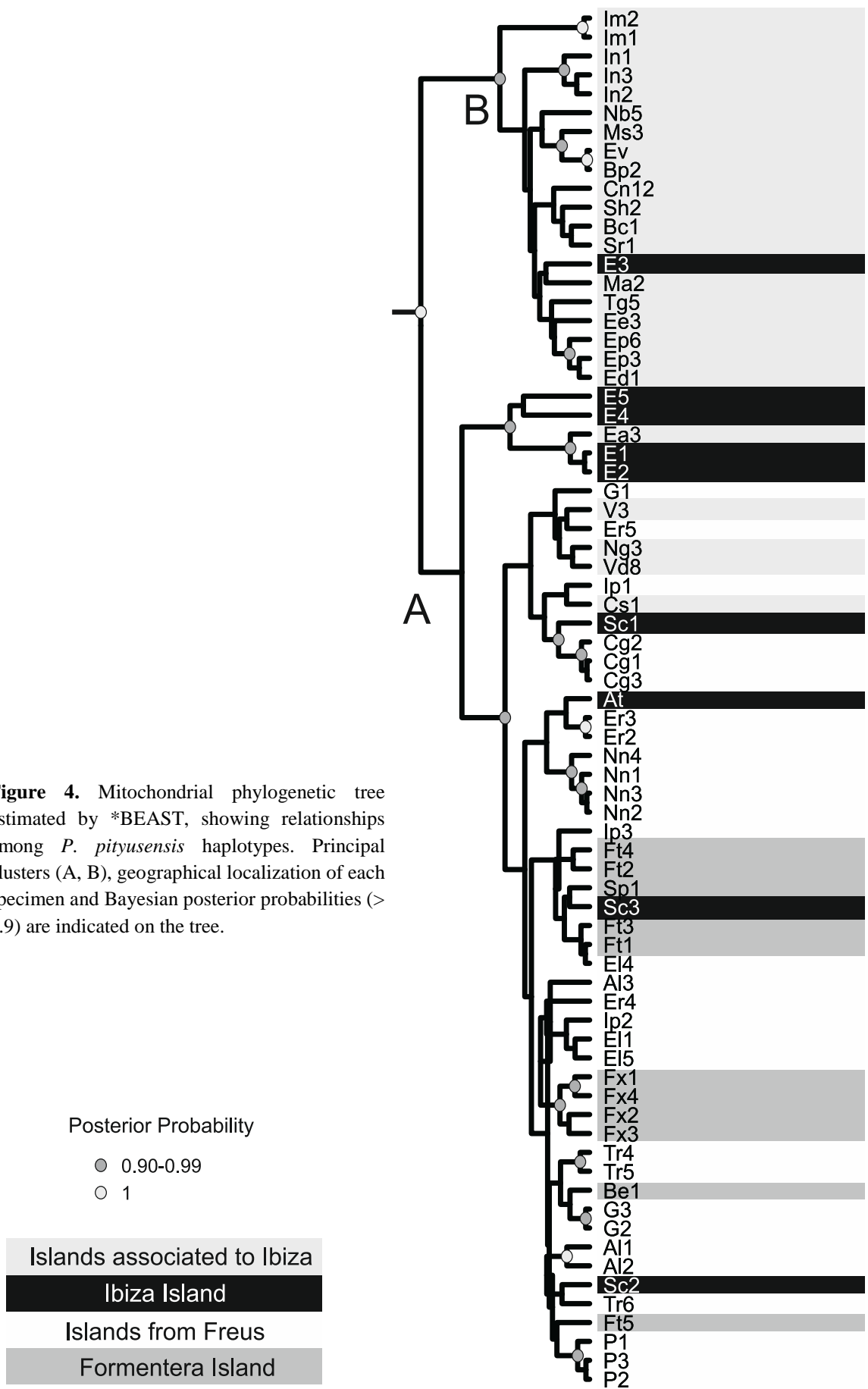
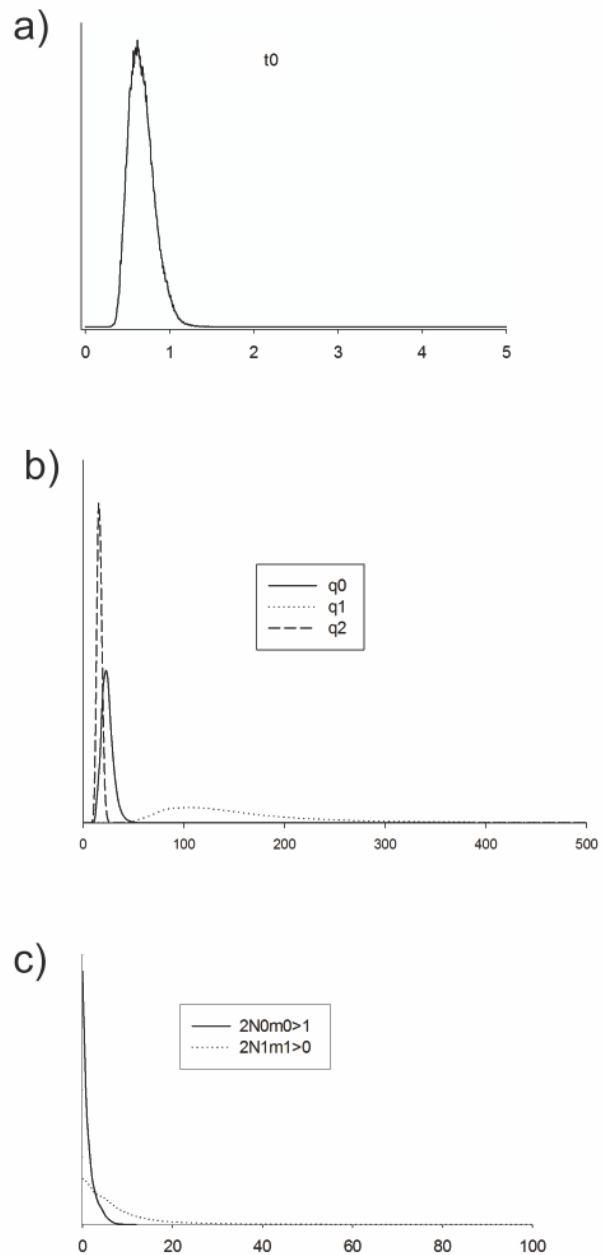


Figure 5. Posterior densities for (a) splitting time (t_0), (b) population sizes (q_0 , q_1 , q_2) and (c) population migration ($2N_0m_0 > 1$ and $2N_1m_1 > 0$; in coalescent time) estimated using IMA2, where population 0 correspond to Formentera and Freus islands, population 1 to Ibiza and associated islands and population 2 to the common ancestor.



Discussion

We confirm the prediction of lower intraspecific diversity in *P. pityusensis* from the Pityusic group of Balearic Islands, than that identified previously in *P. lilfordi* from the Gymnesic group. This is largely due to the presence of two extant intraspecific lineages with a very recent origin in *P. pityusensis*, as opposed to five lineages (some of which date to the early Pleistocene or earlier) in *P. lilfordi* (Brown *et al.* 2008). Possible biogeographical scenarios that could explain the origin of the *P. pityusensis* lineages are discussed below. Our second major finding is that two major genetic groups are detected within both the microsatellite loci and mtDNA. While this could help recognition of units for conservation, this is complicated by evidence of some geographical discordance between markers (see below). Finally, our coalescent analyses detect non-zero migration since isolation between geographical regions that are currently isolated by sea channels.

The finding of relatively high migration between the Ibiza and Formentera regions could be explained by recent introductions. There are well documented records of translocations of lizards between islets (Böhme & Eisentraut 1981) and, although we

did not use specimens from these populations, it would seem likely that there have been additional introductions that we are unaware of. For example, the pattern found in Formentera and associated island populations appears to evidence recent introductions. Specimens from this region are largely homogenous in terms of mtDNA, but several Formentera specimens show high affinities with Ibizan populations in terms of nuclear microsatellites. The presence of admixed individuals provides evidence of hybridization and intermediate membership coefficients (of around 0.5 in some cases) even suggest first generation hybrids. A second example of possible introductions is found in the Ibizan populations. They form a clear genetic cluster in terms of nuclear microsatellites. However, the mtDNA of the majority samples from the main island of Ibiza, as well as some associated islands (Es Canar, Vedrà, Vedranell, Na Gorra and Cala Salada), corresponded to the Formentera group. This could be explained by mitochondrial capture after introductions from Formentera which could arise under a selective advantage for Formentera mtDNA, a relatively common explanation of mitonuclear discordance (Toews & Brelsford 2012). We detected greater effective migration of gene copies from Formentera to Ibiza, which supports this hypothesis. Some Ibiza specimens were clearly distinct from Formentera in terms of both nuclear and mtDNA (two specimens from the main island and those from the offshore islets of Espartar, Escull d'Espartar, Espardell de s'Espartar, Bosc, Na Bosc, Bleda Plana, Escull Vermell, Conillera, Illa Murada, Ses Margalides, s'Hort, Tagomago, Ses Rates, Illa Negra and Malvins Pla). This appears to be of considerable significance for the conservation genetics of this species. The offshore populations in particular will have been isolated from the effects of mitochondrial colonization of the main island populations, and so represent the genetic composition of the original Ibiza lineage prior to putative introductions. These populations therefore merit special conservation measures because they represent the Ibizan lineage prior to introductions. Of course, we cannot be certain that mitonuclear discordance is not due to incomplete lineage sorting. However, the observed biogeographical patterns do not generally show the random characteristics that might be expected if this was the case (Funk & Omland 2003; Toews & Brelsford 2012). Also, the populations are highly fragmented and have probably been this way for some time, which seems to rule out causes that involve high levels of natural gene flow between divergent lineages, such as sex-biased differences in hybridization.

P. pityusensis is an endemic island vertebrate which makes it more prone to extinction (Frankham 2003). It exists mostly in small fragmented populations with reduced gene flow. Small fragmented populations are expected to suffer both immediate effects of genetic diversity loss (inbreeding and fixation of deleterious alleles) as well as longer term effects such as decreased long-term ability to adapt to environmental change (Frankham 2003). This means that descriptions of patterns of genetic diversity and identification of management units are essential for conservation strategies.

Recent introductions preclude easy definition of evolutionary significant (ESU) or other management units. ESUs are a common output from conservation genetics studies and of considerable use in ensuring that the evolutionary heritage that has led to high genetic and ecological distinctiveness is recognized and protected (Funk *et al.* 2012; Reilly *et al.* 2012). The criteria frequently used for recognition of ESUs based on mtDNA and microsatellite data are reciprocal monophyly and significant divergence of alleles frequencies, respectively (Moritz 1994; Fraser & Bernatchez 2001). These criteria are only met in *P. pityusensis* if we do not consider islands/islets where lizards appear to have been introduced. This would mean that many of the populations adjacent to Ibiza (but excluding Ibiza itself) would represent one ESU, while most of the Formentera and Freus populations (with the exception of those showing Ibizan microsatellite alleles) would represent a different ESU.

There was no genetic support for the ~23 morphological subspecies of *P. pityusensis*, a finding which is not unusual in vertebrates (Zink 2004). Small genetic differences may explain the morphological characteristics on which some of these subspecies are based. For example, three of the populations are melanic and it has been shown that small genetic substitutions in certain genes can cause dark/light variation in dorsal colour within some species (Rosenblum *et al.* 2010)(note that a recent study rules out an association between the *mc1r* gene and melanism in *P. pityusensis*: Buades *et al.* 2013). It would seem inappropriate to base an intraspecific taxonomy on discrete genetic differences that do not closely reflect the population tree. However, the recognition of distinct taxa could help promote conservation of these unique morphological forms. They may represent adaptive variations that could be important for the future existence of the species by providing a reservoir of genetic variation for the species. Another way to

conserve morphological diversity, besides the maintenance of distinct taxa, is to identify Managements Units (MUs). MUs are defined as demographically independent populations, whose populations dynamics depend largely on local birth and death, rather than on immigration (Palsbøll *et al.* 2007; Funk *et al.* 2012). Non-genetic measures, such as the degree of similarity of morphological traits, could be used to define MUs (Palsbøll *et al.* 2007). In *P. pityusensis*, some phenotypes are associated with specific small islands or islets, which could be delineated as MUs. For example, specimens from Bleda Plana and Escull Vermell islands are melanic and have been assigned to *P. p. maluquerorum* (Mertens 1921). It exists as two demographically independent populations and could be defined as a MU, which would help conserve this component of the morphological diversity.

It is useful to speculate on the biogeographical scenario that underpins the origin of the two main lineages in *P. pityusensis*. Lizard diversity across and within-islands is often explained by ancient dispersal between distant islands and population vicariance due to geophysical events within islands (Brown & Pestano 1998; Malhotra & Thorpe 2000; Stenson *et al.* 2004; Cox *et al.* 2010). Smaller sizes and closer proximities of islands within the Ibiza and Formentera group could reduce the potential for lineage divergence in *P. pityusensis* compared with its sister taxon *P. lilfordi*. However, a more reasonable explanation is that ancient *P. pityusensis* lineages have been lost through extinctions. It seems unlikely that gene flow was so high between these highly fragmented populations that cladogenesis was impeded from the time of the origin of the species (5.33 Ma) until just 0.1–0.3 Ma (our estimate of the time of the most basal divergence within *P. pityusensis*). Instead, it seems more credible that lineages appeared and subsequently became extinct. Ibiza is relatively high (487 m), as are some of its associated islets (e.g., Vedrà, 381 m and Tagomago, 115 m), but most of Formentera (and many offshore islets) is below 50 m (although it does contain two peaks of 105 m and 197 m). As a result, Formentera would have been largely flooded by temporary Plio- and Pleistocene rises in sea-level, providing a potential extinction mechanism. There is some evidence to support a major rise in the Mediterranean sea level some 0.6 Ma (Emig & Geistdoerfer 2004), which fits this pattern because it considerably predates the divergence of the Ibiza and Formentera groups. This was followed by significant drops in sea-level ~0.5 Ma, around 0.15 Ma and again during the last glacial maximum (MIS

2, 0.02 Ma, with decreases of 120 m) (Emig & Geistdorfer 2004). These falls in sea-level must have joined Ibiza and Formentera, which are separated by a channel of only 50 m. These dates do not seem to be incontrovertible. In Mallorca, sea-level increases of 55, 35 and 8 m have been proposed for marine isotopic stages (MIS), corresponding to interglacial periods, eleven (0.4 Ma), nine (0.33 Ma) and seven (0.2 Ma) (Butzer 1975; Cuerda 1975), while during the last interglacial (MIS 5; 0.085–0.135 Ma) sea level decreases of 15 and 20 m have also been proposed (Dorale *et al.* 2010). Despite these differences there does seem to be a consensus that there was a sea-level rise prior to the estimated divergence time which could have led to the extinctions of ancient populations/lineages in low lying areas across Formentera and many of the islets. Recolonization of previously flooded islands would be most likely when between-island channels were exposed by drops in sea level and subsequent rises in sea-level would in turn isolate these populations. The divergence times that we estimated between the two *P. pityusensis* populations could therefore be explained by isolation of Formentera populations that had previously colonized the island from Ibiza.

Finally, it is important to consider the population divergence times using *BEAST and IMA2 with reference to estimates of sequence divergence times obtained by a previous analysis (Brown *et al.* 2008). Divergence time estimates are considerably more recent than those estimated previously, despite a similar tight calibration on the (*P. lilfordi*, *P. pityusensis*) node. For example, the oldest sequence divergence within *P. pityusensis* was previously estimated as 0.94 Ma ago, while here population divergence is estimated at around 0.2 Ma ago. This is largely expected because these new analyses account for the ancestral polymorphism within populations. This approach has also been found to considerably reduce estimated timing of shallow population divergence in other species (Brown *et al.* 2012). Bayesian dating of shallow phylogenies requires considerable care (Brown & Yang 2010). Here, we aimed to overcome the main sources of error by using a strict clock and a substantial amount of informative sequence (Brown & Yang 2011). Nevertheless, the problem of unexpected prior distributions is still potentially problematical (Heled & Drummond 2012). The similarity of the mtDNA based *BEAST estimate and the mtDNA and microsatellite based IMA2 estimates of population divergence time provided confidence in their robustness, although important differences need to be outlined. First, the *BEAST analysis estimated timing between the two major

mtDNA population units. This appeared sensible because we solely aimed to date the population split that led to these two mtDNA lineages. In contrast, the IMa2 analysis was used to estimate time since population splitting and migration of gene copies between the two geographical populations, using both microsatellites and mtDNA (*BEAST does not incorporate migration). Second, time calibrations within the two approaches were related because the mutation rate in IMa2 and the species node calibration in *BEAST were based on the post-Messinian divergence of the two Balearic *Podarcis*. However, divergence time in years in IMa2 requires an estimate of generation time adding uncertainty to the estimates. In sum, the fact that both methods provide results that fit with our biogeographical scenario, despite the existence of significant differences between them, provides considerable confidence in the estimated divergence time.

To summarize, we have applied coalescent analyses to microsatellite and mtDNA data to provide insights into the evolutionary history of this island endemic. We find strong evidence for two genetic groupings which we believe may have been initiated by changes in sea-level, as well as finding evidence that the current phylogeographical distribution is quite likely to have been influenced by man-mediated introductions. The genetic integrity of ancient lineages is compromised by these introductions, although our study allows us to identify genetically “uncontaminated” populations that may be important when formulating conservation policy.

Acknowledgements

We are grateful to the IFISC (Institute for Cross-Disciplinary Physics and Complex Systems), we used the Nuredduna Mosix cluster to run IMa2 analyses, and we thank J.A. Jurado for computational support. This work was financed by the research grants CGL2009-12926-C02 and CGL2012-39850-C02 of the Ministerio Español de Economía y Competitividad and European Regional Development Fund (ERDF). V.R. was granted with an FPI fellowship from Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats (Govern de les Illes Balears), co-financed by European Social Fund.

Data Accessibility

- DNA sequences: Genbank accessions JX852045-JX852108 and JX852118-JX852137.
- IMa2 input file: Dryad Digital Repository. doi: 10.5061/dryad.r1538

Análisis preliminar de poblaciones introducidas de *Podarcis pityusensis*

En marzo de 1930, Eisentraut introduce lagartijas en islas donde no había previamente (Böhme & Eisentraut 1981), en el ámbito del Archipiélago Pitiuso. Realiza cuatro experimentos: i) la población de Dau Gran se funda con ocho machos de Escull Vermell y 20 hembras procedentes de la isla de Ibiza (Salvador 1984), observando, posteriormente, que los descendientes se parecen a *P. p. maluquerorum* respecto a la folidosis y las proporciones, mientras que presentan una mezcla de los parentales respecto a coloración y diseño (Pérez-Mellado 1998); ii) en Es Vaixell se introducen 51 especímenes y iii) en Escull de Tramuntana, 24, en ambos casos procedentes de la isla de Ibiza, y, por último, iv) en la Isla Negra Este, 50 lagartijas originarias de Bleda Plana (Salvador 2006b).

Individuos procedentes de estas islas fueron descartados, en principio, del análisis principal de la especie. En este análisis preliminar, se investiga su relación con el resto de individuos de *P. pityusensis*, e intenta situar su posición dentro de la especie pitiusa, básicamente, con un sólo objetivo, determinar a qué poblaciones se encuentran más próximas genéticamente. Para internar aclarar esta cuestión, se reanalizan los datos obtenidos para *P. pityusensis* en Rodríguez *et al.* (2013), esta vez incluyendo once especímenes, previamente descartados, y originarios de Es Vaixell, Dau Gran y Murada, una población introducida en la isla de Mallorca, cerca de la catedral de Palma. Las muestras se procesan siguiendo la misma metodología que el resto de especímenes de *P. pityusensis* en Rodríguez *et al.* (2013), realizándose análisis de agrupamiento.

Como resultado (datos no mostrados), se observa que las muestras de Es Vaixell quedan incluidas en el clado de las islas de Ibiza, junto a Na Gorra, con ambos marcadores, asimismo los especímenes de Murada, se incluyen en el clado de Formentera, también en análisis con ambos marcadores. Por último, Dau Gran presenta individuos que se unen a uno y otro clado, por lo que en esta isla pueden observarse ambos linajes: el ancestral de Ibiza y el de Formentera.

CAPÍTULO II:
ARCHIPIÉLAGO MALTÉS



**Genetic diversity and historical biogeography of the Maltese
Wall lizard, *Podarcis filfolensis* (Squamata: Lacertidae)**

V. Rodríguez, R.P. Brown, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado,
A. Picornell, J.A. Castro, M.M. Ramon

Conservation Genetics (2014) 15: 295–304

Este segundo capítulo se centra en el Archipiélago Maltés, área natural de *Podarcis filfolensis*, pero también en las Islas Pelágicas, donde se introduce esta especie en tiempos recientes. Once microsátélites, un gen nuclear y cinco fragmentos mitocondriales, se analizan en treinta y tres individuos de *P. filfolensis*, muestreados en nueve localidades del Archipiélago Maltés, y dos del Archipiélago Pelágico. Los resultados muestran baja variabilidad genética intraespecífica, y dos linajes mitocondriales principales, que se corresponden con áreas geográficas –Malta vs. resto de islas–, y que comparten un ancestro común hace 869–105.4 Ka. Con marcadores nucleares se identifican tres grupos: uno incluye individuos de Malta, mientras que los otros dos comparten individuos del resto de islas. Como conclusión, se recomienda una revisión del estatus de conservación de la lagartija maltesa.

Estos resultados se publican con el título “*Genetic diversity and historical biogeography of the Maltese Wall lizard, Podarcis filfolensis (Squamata: Lacertidae)*”, en *Conservation Genetics*, revista que ocupa la posición décimo séptima (de 41) en la categoría de Conservación de la Biodiversidad, con un factor de impacto de 1.846 (*Journal Citation Reports, Web of Knowledge*).

**Genetic diversity and historical biogeography
of the Maltese wall lizard,
Podarcis filfolensis (Squamata: Lacertidae)**

Virginia Rodríguez, Richard P. Brown, Bàrbara Terrasa, Valentín Pérez-Mellado,
Antònia Picornell, José A. Castro, Cori Ramon

Abstract

Podarcis filfolensis is an endemic lizard from the Maltese archipelago. There is evidence of human-mediated decline and even extirpation of some insular populations of this species. However, information about the intraspecific genetic diversity and phylogeographic patterns of this species is limited. Here we analyze genetic markers from a multi-locus dataset (mtDNA, 2533 bp; nuclear *c-mos* gene, 353 bp; 11 microsatellites) for individuals from extant populations of *P. filfolensis*. Despite generally low genetic variability, two main mitochondrial groupings were clearly identified. In general, individuals from the main island of Malta were genetically distinct from those from Gozo, Comino, Cominotto and Small Blue Lagoon Rock, and also from Linosa and Lampione individuals. Three genetic clusters were detected based on microsatellite data: one was found at higher frequency on Malta, while the other two included samples from the remaining islands, showing some concordance with the mtDNA pattern. A time-calibrated Bayesian tree for the principal mitochondrial lineages indicated strong statistical support for two *P. filfolensis* lineages that originated in the Pleistocene (105.4–869 Ka). We show that these lineages largely meet the criteria for recognition as evolutionary significant units despite some recent admixture (possibly due to recent translocations between islands). Human disturbance, low genetic variability, evidence of bottlenecks and extirpation on one island indicate that a thorough review of the current conservation status of *P. filfolensis* would be timely.

Key-words: conservation, Maltese archipelago, microsatellites, mitochondrial DNA, *Podarcis filfolensis*, species tree

Introduction

A variety of man-mediated effects have had major impacts on patterns of species richness and biogeography of islands. In several Mediterranean islands, the ongoing decline and extinction of reptile species is directly related to human influence (Ficetola & Padoa-Schioppa 2009). This appears to be the case in the Maltese archipelago (Schembri 1993; Cassar *et al.* 2008). Unrelenting anthropogenic pressures are severely affecting the biodiversity of the Maltese islands, with the Island Directory from the United Nations Environment Program rating Malta as being 4th (of 234 islands assessed) for Human Impact (<http://islands.unep.ch/Tihi.htm>) and 3rd for Terrestrial Conservation Importance (<http://islands.unep.ch/Tici.htm>).

The Maltese archipelago consists of three main islands: Malta, Gozo and Comino and a number of small uninhabited islets: Cominotto, Filfla, St. Paul's Island, Fungus Rock (General's Rock) and a few minor rocks (Schembri 1994). These islands are part of the Pelagian Platform (Micallef *et al.* 2012), a large area located between Sicily and North Africa, and emerged 7–5 Ma ago as a result of tectonic plates collision. The Maltese region would have been colonized by species from both Europe and Africa (Cassar *et al.* 2008) as a consequence of the drying out of the Mediterranean basin during the Messinian Salinity Crisis (MSC) 5.33 Ma ago (Krijgsman *et al.* 1999) when terrestrial organisms would have been able to migrate to the area. At the end of the MSC, the Mediterranean basin reflooded and the Maltese islands were isolated, although some reconnections with Sicily were occasionally re-established during Pleistocene glaciations (Thake 1985; Hunt & Schembri 1999). Sicily and the Maltese islands were last joined during the last glacial maximum (MIS 2, 24 Ka), when sea levels dropped 120–130 m. Within the Maltese islands, the largest islands of Gozo and Malta only recently became fully isolated 7.2–7 Ka (Furlani *et al.* 2013). Progressive colonization of the islands during historical changes in sea-level seems to have led to the current biota, a similar scenario to other Mediterranean islands and species (Podnar *et al.* 2005; Brown *et al.* 2008; Agulló *et al.* 2011; Bauza-Ribot *et al.* 2011).

The Maltese wall lizard, *Podarcis filfolensis* (Bedriaga 1876), is a medium-sized lizard endemic to the Maltese islands (Savona Ventura 1983; Corti & Lo Cascio 1999; Schüter 2005). The species is also believed to have been introduced into two of the

Pelagian Islands (situated in the Channel of Sicily), Linosa and Lampione, although it is not clear when this introduction took place (Corti & Lo Cascio 1999; Capula 2006; Lo Cascio & Corti 2008). *Podarcis filfolensis* is one of the least-studied species of the genus. Five subspecies have been recognized: four of them in the Maltese islands, *P. f. maltensis* on Malta, Gozo and Comino islands; *P. f. kieselbachi* on St. Paul's Island; *P. f. filfolensis* on Filfla Island and *P. f. generalensis* on Fungus Rock, and one subspecies in the Pelagian Islands, *P. f. laurentiimuelleri* (Scalera *et al.* 2004; Sciberras & Schembri 2008). Specimens from Cominotto were also considered as a new subspecies by Savona Ventura (1983), but he did not describe them formally. The named subspecies differ mainly in mean body size and coloration, especially with respect to the gular region of males and the degree of dark markings on the black, flanks and ventral region of the neck (Sciberras & Schembri 2008).

Like many lacertids from Mediterranean islands, *P. filfolensis* was formerly very common throughout the Maltese islands; including Malta and Gozo (see, for example, Despott 1915). Today, however, the species has a patchy distribution on Malta and Gozo, and is common only on some coastal islets (pers. obs.). Maltese wall lizards currently face several threats. On Cominotto, lizards are frequently predated by *Chalcides ocellatus* and possibly by the recently introduced *Chamaeleon chamaeleon* (Sciberras 2007). Maltese lizards are also predated by birds such as woodchat shrikes (*Lanius senator*), kestrels (*Falco tinnunculus*) (Sultana & Guaci 1971), short-toed eagles (*Circaetus gallicus*) (Bannerman & Vella-Gaffiero 1976) and blue rock thrushes (*Monticola solitarius*) (Sultana & Guaci 1971), as well as snakes such as the cat snake (*Telescopus fallax*), the black whip snake (*Hierophis viridiflavus*), the Algerian whip snake (*Hemorrhois algirus*) and the leopard snake (*Rhinechis situla*) (Lanfranco 1955; 1970; Savona Ventura 1979; Lanza 1987; Borg 1989). The St. Paul's Island population now appears to have been extirpated, possibly due, in part, to rat predation (Sciberras & Schembri 2008), but may also be as a result of human interference (pers. obs.). The huge increase in the human population on Malta during the last three decades has resulted in large-scale habitat destruction (Borg 1989). Malta exhibits the highest population density (1300 persons per km²) in the European Union (Eurostat population, 2011), which is further-increased by more than one million tourists per year (Cassar *et al.* 2008; Deidun 2010).

Phylogenetic relationships between *P. filfolensis* and other *Podarcis* have proved controversial: allozyme data suggested *P. filfolensis* is closely related to *P. sicula* (predominantly southern eastern species), and to *Podarcis melissensis* (a species from the east Adriatic coast; Capula *et al.* 1994), while analyses of mitochondrial (mtDNA) data suggested that it was a sister species to *P. wagleriana* (endemic to Sicily and the Egadi Islands), representing an ancient clade closely related to *P. muralis* (Oliverio *et al.* 2000). More recent studies suggest that *P. filfolensis* belongs to an evolutionary clade containing three other Mediterranean island species of *Podarcis*: *P. tiliguerta*, *P. lilfordi* and *P. pityusensis* (Arnold *et al.* 2007).

Preliminary intraspecific analyses of mtDNA genes (tRNA_{Phe} and 12S rRNA) and proteins (electrophoretic analysis of 26 presumptive gene loci), using *P. filfolensis* from three localities (Malta, Filfla and Linosa islands), showed that the Maltese specimens (Malta and Filfla) are closely related to each other, and that these are genetically differentiated from those from Linosa Island, which showed high levels of genetic variability (Scalera *et al.* 2004).

Our primary aim is to establish patterns of genetic diversity within *Podarcis filfolensis*. We achieve this, using sensitive nuclear microsatellite loci, together with mtDNA sequences as an alternative marker. Establishment of genetic structuring within the Maltese archipelago is the first step in determining management units that will underpin future conservation strategies.

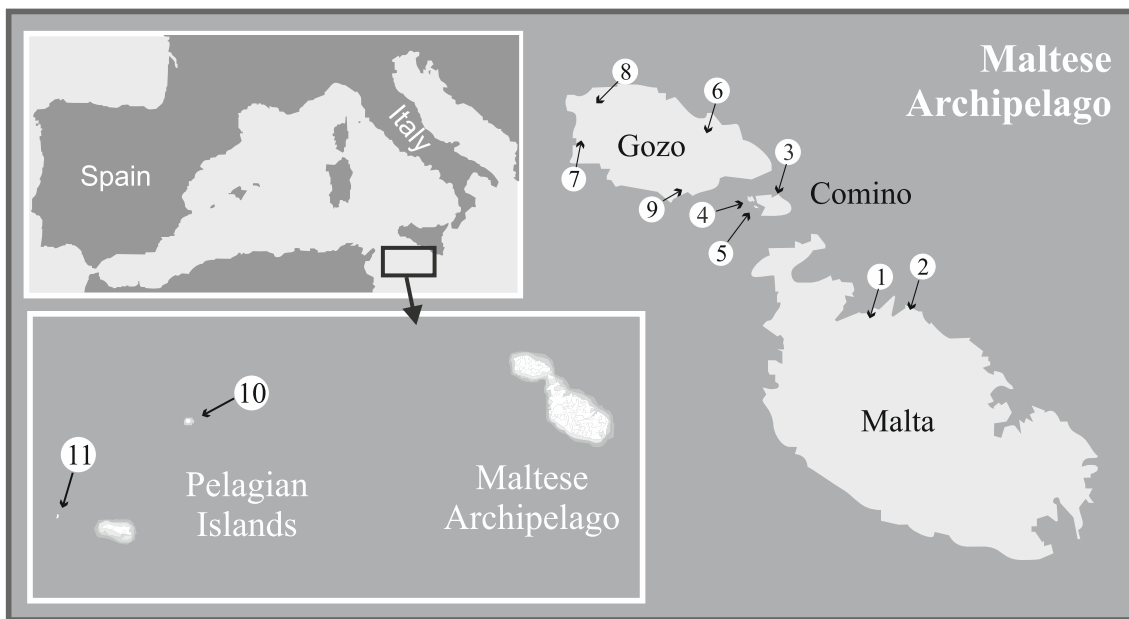
Material and methods

Samples and DNA isolation

Thirty-three *Podarcis filfolensis* were captured by noosing in 2007/2008, under official licenses from MEPA (Environment Protection Directorate of Malta; permit: NP00051/07), and tail-tips were removed before releasing the individual at the site of capture. Tissue samples were stored in 100% ethanol. DNA was subsequently extracted using a phenol-chloroform protocol similar to that described by Sambrook *et al.* (1989). The *P. filfolensis* were from Malta ($n=7$; Fig. 1A, localities 1, 2), Comino ($n=5$; Fig. 1A, locality 3), Cominotto ($n=5$; Fig. 1A, locality 4), Small Blue Lagoon Rock ($n=5$; Fig. 1A, locality 5) and Gozo ($n=9$; Fig. 1A, localities 6–9) from the Maltese archipelago, as well

as Linosa and Lampione (one each) in the Pelagian Islands (Fig. 1A, localities 10, 11). The low population density on Malta Island (Grech, 1999 and personal observations) only allowed samples to be collected at two locations (Buggiba and Ghallis Point). Samples from the rocky islets of Filfla (5km south of Malta) and Fungus Rock (at the mouth of a small bay on the west coast of Gozo) were not collected because the local authorities did not grant authorization. This was also the case for St. Paul's Island, although we visited this island twice to assess lizard densities (September 2007 and May 2008).

A)



Malta ●	Comino ○	Gozo ○	Pelagian Islands ○
1 - Buggiba (St. Paul Bay)	3 - Comino	6 - Ramla	10 - Linosa
2 - Ghallis Point	4 - Cominotto	7 - Dwejra Bay	11 - Lampione
	5 - Islet in the Comino	8 - Gordan Far	
		9 - Mgarr-ix-Xini	

B)

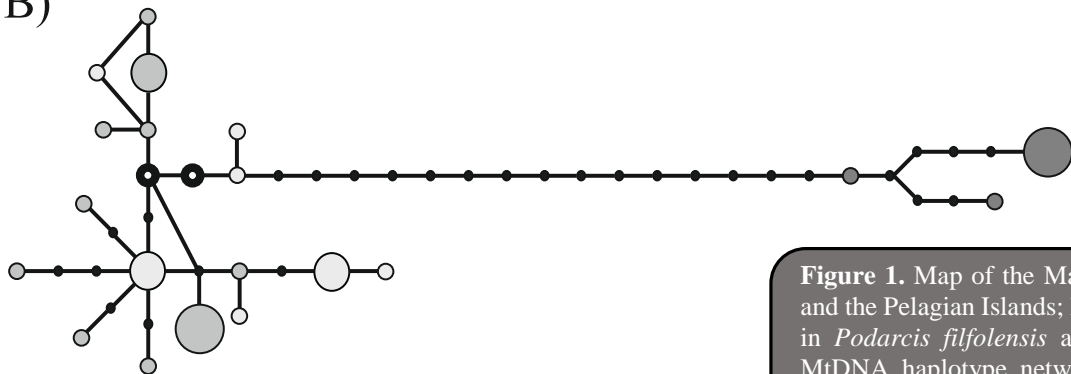


Figure 1. Map of the Maltese archipelago and the Pelagian Islands; localities sampled in *Podarcis filfolensis* are indicated (A). MtDNA haplotype network for *Podarcis filfolensis*, including samples from the Pelagian Islands (B).

Microsatellite data

We genotyped *P. filfolensis* specimens with eleven microsatellite loci that had been isolated from the closely-related *P. lilfordi* (Bloor *et al.* 2011). PCRs were run in a GeneAmp PCR System 2700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using primers and conditions described in Bloor *et al.* (2011). Fluorescently labeled PCR products were run on an ABI 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with GeneScan-500 (LIZ) internal size standard, and fragment length was assigned with GeneMapper software v. 3.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Allele assignment was the same as those described by Bloor *et al.* (2011).

General statistics of microsatellite diversity and a population bottleneck index, M (Garza & Williamson 2001), were obtained using Arlequin v.3.1.1 (Excoffier *et al.* 2005). An analysis of molecular variance (AMOVA) was also computed to determine genetic structure between geographic populations (Malta vs. Gozo, Comino and adjacent islets). The number of genetically distinct clusters was estimated using STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) and STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012). STRUCTURE was run twenty times, each run comprising 400000 steps (200000 discarded as burn-in), using an admixture model and correlated allele frequencies among populations for all values of K from 1–10. The programs STRUCTURE and CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) were used to determine the estimated membership coefficient (Q), and assign individuals to populations. We applied a threshold value of 0.20, as this provides a greater efficiency and accuracy to differentiate between purebreds and hybrids (Vähä & Primmer 2006): Q values between 0.2–0.8 may indicate hybridization between individuals from different clusters.

Nuclear gene sequence

Partial sequences from the proto-oncogene *c-mos* were amplified and sequenced following primers and conditions described by Terrasa *et al.* (2009). Sequences were edited and aligned by BioEdit v.7.0.5.2 (Hall 1999), and TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000) was used to construct a haplotype network.

Mitochondrial data

Five mtDNA fragments were amplified for each specimen and sequenced to provide partial genes sequences from the following regions: (i) partial 12S rRNA, (ii) short partial cytochrome *b* (cytb), (iii) long partial cytb and partial tRNA_{Thr}, (iv) partial control region, (v) two partial subunits of the NADH dehydrogenase gene and associated tRNAs (referred to as ND1, ND2, tRNA_{Ile}, tRNA_{Gln}, and tRNA_{Met}). Primers and amplification conditions are the same as those used for *P. lilfordi* (Terrasa *et al.* 2009) and *P. pityusensis* (Rodríguez *et al.* 2013). Both heavy and light strands were sequenced on an automated ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using a BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and edited and aligned using BioEdit v.7.0.5.2 (Hall 1999).

Basic genetic diversity indices and neutrality statistical tests were calculated using DnaSP v.5.10.01 (Librado & Rozas 2009), and an analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted in the same way as for microsatellite data. Bayesian inference of population structure was determined using BAPS v.5.3 (Corander *et al.* 2003), with an upper bound of K=30, and without prior information on geographic location.

A statistical parsimony network, with a 95% connection limit, was constructed using mtDNA sequences from both the Maltese archipelago and the Pelagian Islands using TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000), in order to examine mtDNA relationships.

Species phylogeny and divergence times

Divergence times and phylogenetic relationship between the main *P. filfolensis* mitochondrial lineages, identified by BAPS, and main lineages from the related species *P. pityusensis* (Rodríguez *et al.* 2013) and *P. lilfordi* (Brown *et al.* 2008) were estimated using the multispecies coalescent approach (program: *BEAST v. 1.7.4; Heled and Drummond 2010; Drummond *et al.* 2012). The major advantage of this method is that it allows estimation of divergence times while taking into account within-population ancestral polymorphism (of mtDNA in this case). We use the term ‘population tree’, to describe the resultant tree which shows the historical relationships among potentially

noninterbreeding *Podarcis* populations (rather than recognized species). We used nine populations in the analysis. These were: *P. lilfordi* from (i) Menorca, (ii) West Mallorca, (iii) N & S Mallorca & N Cabrera, (iv) South Cabrera and (v) Cabrera (see Brown *et al.* 2008); *P. pityusensis* from (i) Formentera, Freus islands and Ibiza and (ii) Ibizan islands (see Rodríguez *et al.* 2013); *P. filfolensis* from (i) Malta, and (ii) remaining islands, as described here. We calibrated the (*P. lilfordi*, *P. pityusensis*) species nodes on the tree using the Normal distribution $N(5.325, 0.0001)$, based on the end of the Messinian Salinity Crisis (5.33 Ma; see Brown *et al.* 2008 and Rodríguez *et al.* 2013 for more details). The time of the most recent common ancestor (MRCA) of all *P. pityusensis* was loosely constrained using the Gamma distribution as $G(5.8, 0.2)$ and the MRCA of *P. lilfordi* was loosely constrained as $G(3.48, 0.5)$ to provide a slightly greater prior density around divergence times that are within the same ballpark as the posteriors obtained in our previous analyses (Brown *et al.* 2008; Rodríguez *et al.* 2013).

We analysed eight partitions: (i) 12S rRNA, (ii) control region, (iii) all tRNAs, (iv) 1st and 2nd codon positions of the ND1/ND2 sequences, (v) 3rd codon position of ND1/ND2, (vi) 1st codon position of cytb, (vii) 2nd codon position of cytb, (viii) 3rd codon position of cytb, under evolutionary models identified using MrAIC v. 1.4.4 (Nylander 2004), following AICc (Akaike Information Criterion corrected for small samples). When the “best” model was not available in *BEAST, we used the next most complex model.

All *BEAST (Heled & Drummond 2010) analyses started with a random tree, with the MCMC chain being run for 300 million generations, sampled every 10000 steps. A strict clock model was applied (see Brown and Yang, 2011) and the tree prior specified using a Yule process. Visual examination of posterior samples that were plotted using Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond 2007) indicated that more than enough initial samples were discarded to ensure burn-in of the chain. TreeAnnotator (BEAST package) was used to combine and analyse the posterior tree samples at stationarity (trees were combined using the maximum sum of clade credibilities criterion).

Microsatellite data: variability and population structure

Thirty-one individuals from the Maltese archipelago were successfully genotyped for all 11 microsatellite loci. Numbers of alleles per microsatellite locus ranged from 2 (Pli10) to 20 (Pli17), with an average number of 10.8 alleles per locus (Table 1). Observed and expected heterozygosities ranged from 0.065 to 0.864 and 0.063 to 0.957, respectively (Table 1). Smaller values for observed compared with expected heterozygosities were indicative of population structuring. Low values for the Garza and Williamson test statistic (M) (range: 0.051–0.351) supported recent size reductions. Pre-defined geographic populations (Malta vs. remaining archipelago) showed that a greater proportion of the variation was within (99.15%) as opposed to between (0.85%) populations ($F_{ST}=0.00851$; $P=0.18$).

Table 1. Genetic variability for microsatellite loci in *P. filfolensis*. Locus names and allele assignment correspond to those in Bloor *et al.* (2011).

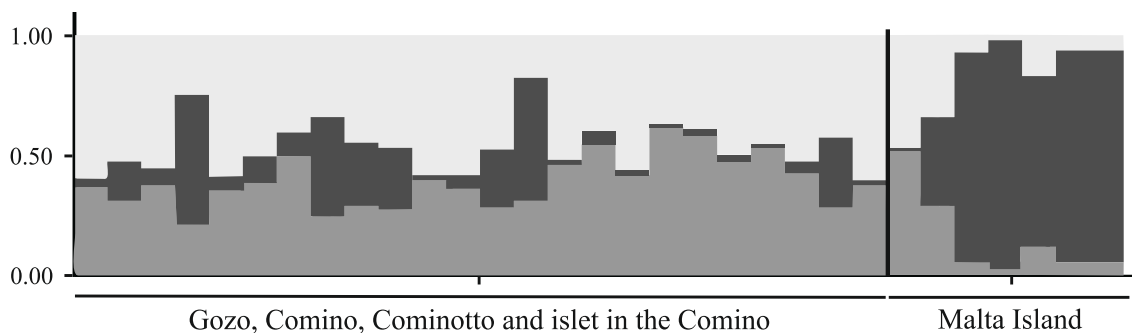
Locus	Num. alleles	Allelic range	Obs. Het.	Exp. Het.	M
Pli2	13	256–310	0.524	0.909	0.236
Pli3	6	247–271	0.286	0.801	0.240
Pli4	16	376–460	0.733	0.928	0.188
Pli6	10	382–420	0.621	0.862	0.256
Pli9	4	331–361	0.267	0.370	0.129
Pli10	2	227/265	0.065	0.063	0.051
Pli12	15	188–254	0.370	0.892	0.224
Pli17	20	233–289	0.864	0.957	0.351
Pli18	13	115–163	0.742	0.893	0.265
Pli21	13	114–196	0.741	0.868	0.157
Pli22	7	103–127	0.355	0.533	0.280

M: Garza and Williamson statistic (2001)

Three genetically distinct clusters (highest value of $\Delta K=0.734$; Fig. 2A) were evidenced with STRUCTURE analyses and Evanno's statistic (Evanno *et al.* 2005). Groups are associated with geographic regions: one of them (cluster I) was distributed in Malta, but also included three admixed individuals (two from Gozo and one from

Comino, with Q ranging from 0.41–0.5); the others clusters (clusters II and III) contained samples from Gozo, Comino, Cominotto and Small Blue Lagoon Rock, along with one admixed individual from Buggiba, Malta (Fig. 1A, locality 1; $Q=0.46$). In general, samples are poorly assigned to clusters (with the exception of Ghallis Point specimens from Malta: Fig. 1A, locality 2), with estimated membership coefficients ranging from 0.38 to 0.58.

A) Microsatellite data



B) Mitochondrial data

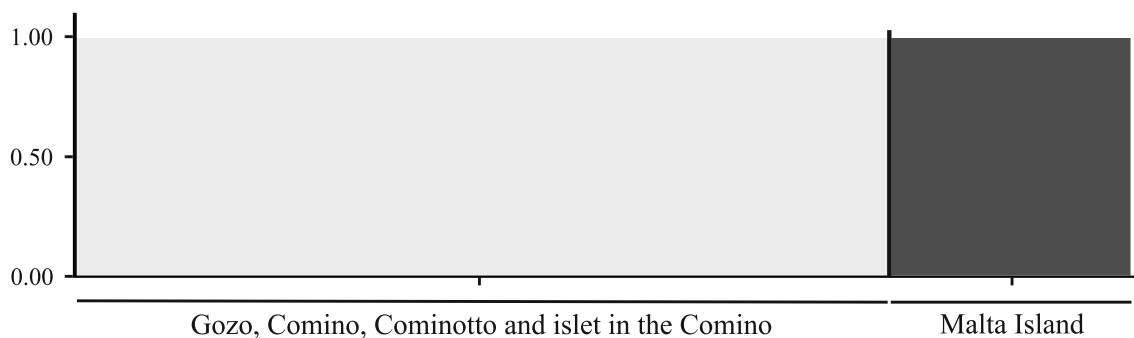


Figure 2. Genetic structure inferred from microsatellites and mtDNA for the two main geographic regions used in this study. A) Microsatellite-based Bayesian assignments identified three main groups (cluster I: dark grey, cluster II: light grey, cluster III: grey). The bar plot shows estimated membership coefficient (Q); vertical bars represent individuals and assignment probabilities. B) Mixture analyses, for mitochondrial data, estimated by BAPS software identified two clusters (cluster A: dark grey and cluster B: light grey). In the Bar plot, vertical bars represent individuals and proportions of admixture, with different colours corresponding to different ancestral sources.

Nuclear gene sequence

The *c-mos* gene was sequenced in twenty six individuals (GenBank accession numbers: KF022080–85), providing a 353 bp alignment. However, this sequence was

found to be relatively uninformative, with only five variable sites resulting in six haplotypes. The haplotype network showed a star-like structure (figure not shown), with the most frequent haplotype found in twelve specimens from different localities, including two individuals from one Malta locality (Buggiba; Fig. 1A, Site1). Individuals from the other Malta locality (Ghallis Point; Fig. 1A, Site 2), had a unique haplotype.

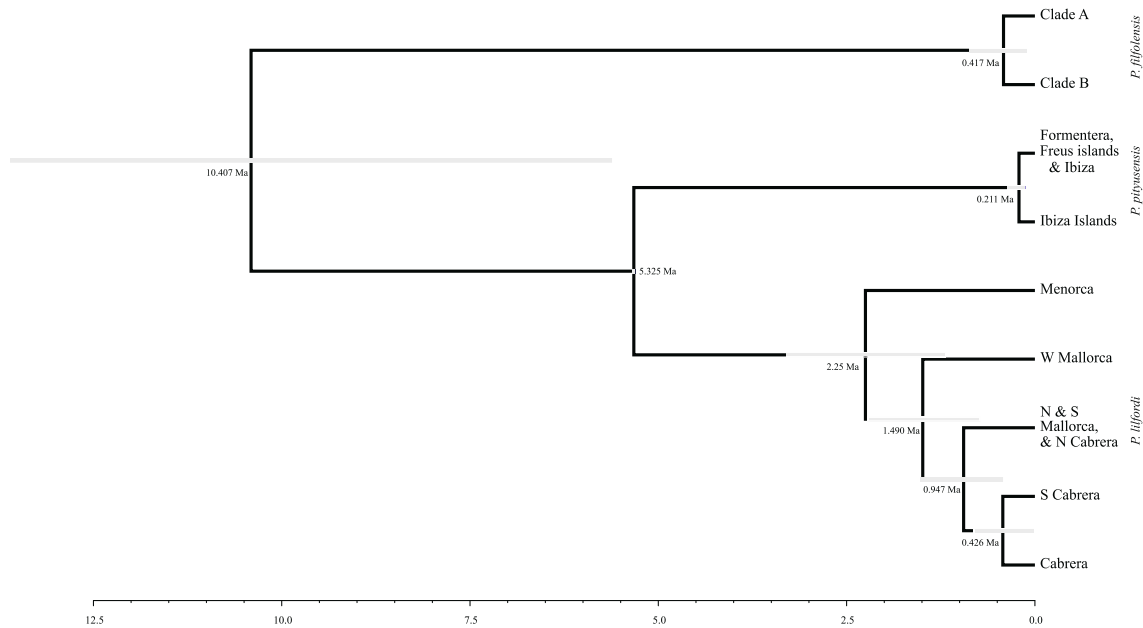


Figure 3. Species tree chronogram estimated by *BEAST. *P. filfolensis* species units corresponded to clusters assigned by BAPS software (Fig. 2B). *P. lilfordi* and *P. pityusensis* species units are those identified by Brown et al. (2008) and Rodríguez et al. (submitted), respectively. White bars correspond to the 95% highest posterior density intervals for each divergence time.

Mitochondrial data: diversity and population structure

Thirty three individuals were analyzed for all five mtDNA fragments. Sequences have been deposited in GenBank under accession numbers: JX852109, JX852112, JX852115, JX852138 and KF022049–79. Analyses of Maltese archipelago specimens (31) revealed 20 different haplotypes in the 2533 bp of concatenated sequence, defined by 41 polymorphic sites, with a mean uncorrected pairwise difference of 9.4 bp (Table 2). Genetic structuring among geographic areas (i.e., Malta vs. rest of archipelago) was

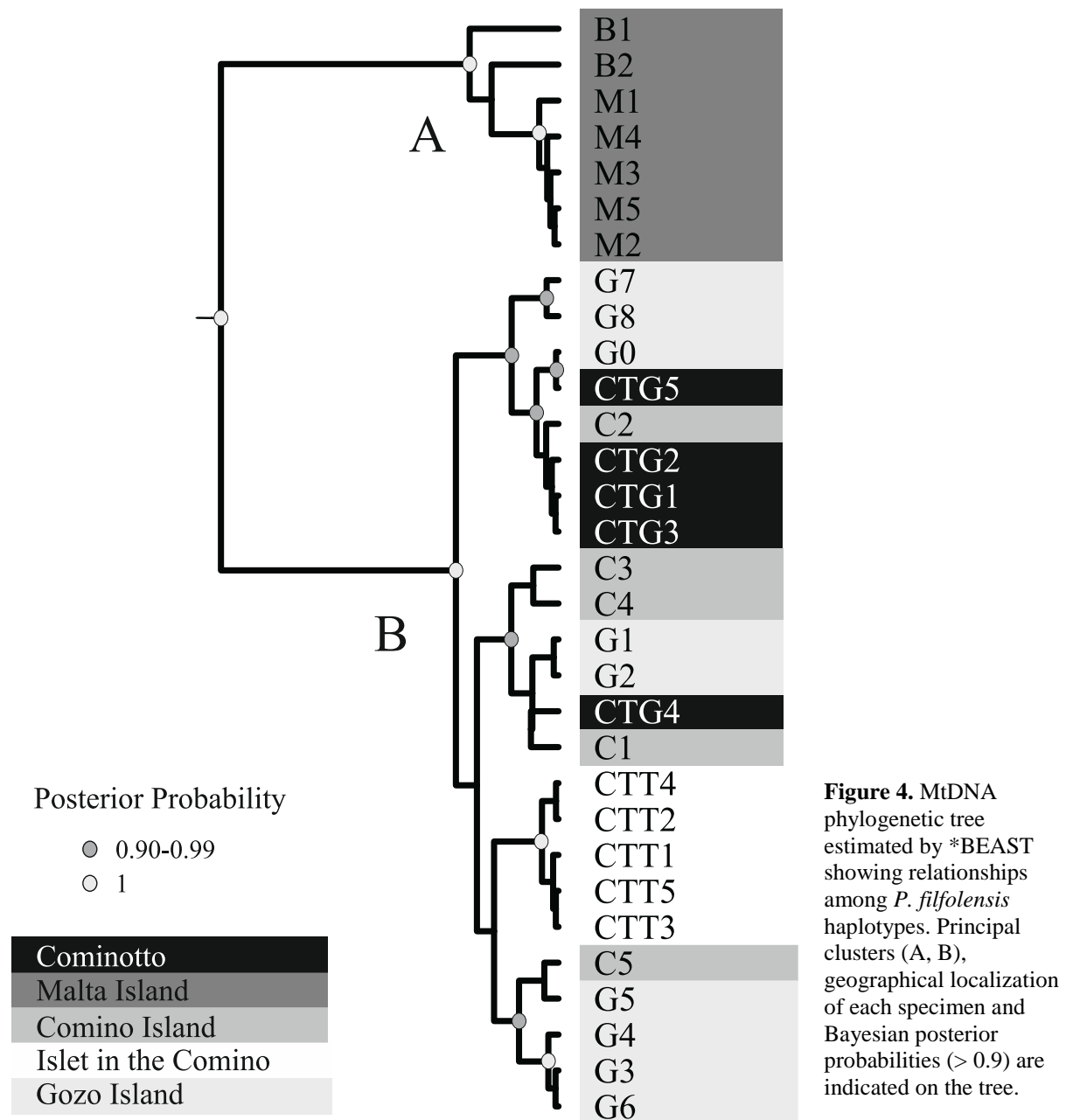
Table 2. Diversity parameters for the concatenated mtDNA fragment in *P. filfolensis* compared with *P. lilfordi* and *P. pityusensis*.

Species	N°	V	N° hap	Nucleotide diversity	K	Fu's Fs (1997)	Fu and Li's D (1993)	Fu and Li's F (1993)	Fay and Wu's H (2000)	Tajima's D (1989)
<i>P. lilfordi</i> #(2382 bp)	117	189	62	0.019±0.005	45.067±19.503	-1.129 ^{ns}	0.652 ^{ns}	0.860 ^{ns}	-17.572 ^{ns}	0.770 ^{ns}
<i>P. pityusensis</i> #(2430 bp)	73	90	60	0.004±0.001	9.083±4.17	-56.983***	-2.432**	-2.589**	-25.341**	-1.745*
<i>P. filfolensis</i> (2533 bp)	31	41	20	0.004±0.001	9.355±4.27	-4.097*	-0.681 ^{ns}	-0.668 ^{ns}	-12.409**	-0.325 ^{ns}

N°, number of individuals sampled; V, variable position; N° hap, number of haplotypes; K, average number of pairwise differences;

^{ns} not significant; *P<0.1; ** P<0.05; ***P<0.001.

obtained from data in Terrasa *et al.* 2009 and Rodríguez *et al.* 2013.



examined (AMOVA), showing that most of the variation was among (81.74%) as opposed to within (18.26%) regions ($F_{ST}=0.8174$; $P<0.001$). Mixture analyses using BAPS indicated that partitioning into two clusters gave the highest Log likelihood (-344.0553; Fig. 2B). The first cluster (A) contained all samples from Malta, while the rest of islands in the Maltese archipelago (Gozo, Comino, Cominotto and Small Blue Lagoon Rock) were included in the second cluster (B). These results show that mtDNA genetic diversity is strongly geographically structured. Inclusion of Pelagian Island specimens in the analyses showed their similarity with specimens from Gozo, Comino, Cominotto and

Small Blue Lagoon Rock (cluster B in BAPS). Figure 1B shows the TCS haplotype network.

Species phylogeny and divergence times

For these analyses we used 2371 bp of mtDNA sequence, that was homologous with that available from previous studies. We obtained strong posterior support ($P=1.00$) for the most basal *Podarcis* nodes. The ancestral species node for the *Podarcis* species analysed was dated at 10.41 Ma (95% highest posterior density, HPD: 5.61–13.61 Ma) and the mean posterior divergence time between the two *P. filfolensis* lineages was 417 Ka (95% HPD: 105–869 Ka) (Fig. 3). The mtDNA genealogy for *P. filfolensis* is shown in Fig. 4.

Discussion

Our analyses suggest low genetic diversity within Maltese lizards compared with other *Podarcis*. There are relatively few alleles at the microsatellite loci used here, although the fact that these loci were identified in a different species is likely to be important. Recent size reductions were inferred in our analyses and are a potential cause of this low genetic diversity. MtDNA diversity is also quite low. The closely-related species, *P. pityusensis* has been studied in detail, and two mtDNA clades detected. Given that the divergence time of these *P. pityusensis* clades appears similar to *P. filfolensis* (Rodríguez *et al.* 2013) it is notable that the percentage of within-group mtDNA diversity is much lower in *P. filfolensis*.

Clustering analyses for both mtDNA and microsatellites identified two main groupings that broadly corresponded to distinct geographical areas, i.e., Malta Island versus the remaining islands (Gozo, Comino, Cominotto and Small Blue Lagoon Rock), but this pattern is not entirely supported by nuclear DNA. Samples from the four islands were subdivided into two clusters that were not geographically structured. Also, one of the Malta localities (Buggiba) showed recently admixed individuals that had affinities with the other islands (evidenced in both microsatellites and *c-mos*). This is likely to indicate recent introductions, particularly in view of the categorical structuring of mtDNA lineages between these regions, and may explain why the between region structuring was not significant for the microsatellites.

Specimens from Linosa and Lampione islands grouped with Gozo, Comino, Cominotto and Small Blue Lagoon Rock (Fig. 1B), indicating these two introduced populations may have originated from an ancestor belonging to the same mitochondrial lineage that Gozo, Comino, Cominotto and Small Blue Lagoon Rock. Previously, this similarity between samples from the Pelagian Islands and the Maltese archipelago led Capula (1994) to hypothesize that *P. filfolensis* probably reached the former by human-mediated dispersals events.

It is worthwhile considering the geophysical events that may have played a role in generating the described genetic diversity. Maltese endemics probably reached the archipelago during the MSC, and were isolated after flooding of the Mediterranean basin some 5.33 Ma (Cassar *et al.* 2008). A subsequent rise in sea level around 600 Ka (Emig & Geistdoerfer 2004) may be the origin of divergence of the two principal founding lineages of *P. filfolensis*, which shared a common ancestor (MRCA) around 105.4–869 Ka. This suggests a mid-late Pleistocene intraspecific divergence, which coincides with that observed in *P. pityusensis* (a species that also comprises two main mtDNA and two microsatellite clusters: Brown *et al.* 2008; Rodríguez *et al.* 2013). Sea depths between the Maltese islands are very shallow (15–20 m), so regular connections will have been possible when sea levels dropped.

Under widely accepted criteria, a significant difference, together with the results of the analysis based on mtDNA data, would have provided very strong support for assignment of two Evolutionary Significant Units (ESUs) (Moritz 1994). Nevertheless, given the small sample sizes and the likelihood of between-region introductions lowering the apparent levels of differentiation, we propose that two ESUs are valid for *P. filfolensis* and that these need to be considered in any future management plan. Taken together, the low population density on Malta itself (pers. obs.), the likely extirpation on St. Paul's Island close to Malta, and the evidence of reduced genetic diversity and small population sizes suggests that, at the very least, our proposed Malta ESU merits urgent recognition as a threatened species.

Previous authors have recognized five subspecies. *P. f. filfolensis* and *P. f. generalensis* were not included in our analysis, nor *P. f. kieselbachi* that seems to have

been extirpated. Here, we analyse only two subspecies (*P. f. maltensis* and *P. f. laurentiimuelleri*; as well as the specimens from Cominotto) but their distribution does not match with the two lineages we found. The disparity between the subspecies recognition and our proposal of two ESUs needs to be resolved. An additional problem is that a range of morphological forms overlap between populations, so subspecies assignment would require considerable weighting on geographical location (Sciberras & Schembri 2008). It is important to conserve unique phenotypic and/or ecological diversity, but the enormous variability of *Podarcis* species led to a large number of subspecies in the past. Re-evaluation and the re-assignment of morphological subspecies is therefore needed (Oliverio *et al.* 2000).

Despite being currently assigned to the “Least Concern” category by the IUCN (Corti *et al.* 2009a), the long-term viability of *P. filfolensis* populations in the Maltese archipelago appears rather precarious. Corti *et al.* (2009a) justified this category because, although its extent of occurrence is less than 5000 km², it is common, adaptable, and did not appear to be in decline. Nevertheless, *P. filfolensis* is protected both nationally, by the Environment Protection Act (CAP. 435)-Development Planning Act (CAP. 356)-Flora, Fauna and Natural Habitats Protection Regulations, 2006 (L.N. 311 of 2006; Malta Environment & Planning Authority; MEPA), as a “species of national interest whose conservation requires the designation of special areas of Conservation”, and internationally by the Habitats Directive (Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora; European Commission Environment), where it is listed in Annex IV “species of Community interest in need of strict protection” and by the Bern Convention (Council of Europe), where it is listed in Appendix II “strictly protected species of fauna”. The revision of their conservation status and the promotion of initiatives to protect habitats, especially in Malta, would hopefully ensure the future of this species. A unique island form, the subspecies *P. filfolensis kieselbachi* found on St. Paul’s Island seems to have been extirpated; no specimens were observed despite intensive searching during two visits. Furthermore, population densities appear to be low in other Maltese islands, when compared with other Mediterranean island *Podarcis*. Grech (1999) recorded lizard densities of 14–33 individuals per hectare: values that are far below those recorded in Western Mediterranean islands (Pérez-Mellado *et al.* 2008c). Individuals on the islands

of Gozo, Comino, and surrounding islets were relatively easy to observe, but the distribution and abundance on the main island of Malta, was found to be patchy and generally low. Suitable habitats for lizards were strongly degraded and, although intensive searches in large areas of the island were conducted, we only found specimens in two localities. Therefore, sparse sampling on Malta may have led to extant lineages remaining undetected. However, this would seem rather unlikely given the small size and relatively uniform topography/ecology of the island.

In conclusion, molecular analyses revealed low genetic diversity, but indicated that two ESUs could be recognized in *P. filfolensis*. This finding, together with small population sizes and high levels of human disturbance, lead us to suggest a revision of the conservation status of this lineage by the Red List of Threatened Fauna of the International Union for Conservation of Nature. This should lead to governmental policy initiatives to protect these ESUs.

Acknowledgements

We are grateful to Arnold Sciberras, for specimens from Linosa and Lampione islands. This work was financed by the research grants CGL2009-12926-C02 and CGL2012-39850-C02 of the Ministerio Español de Economía y Competitividad and European Regional Development Fund (ERDF). V.R. was funded by an FPI fellowship from the Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats (Govern de les Illes Balears), co-financed by the European Social Fund.

CAPÍTULO III:
ARCHIPIÉLAGO
CÓRCEGA-CERDEÑA



**A multilocus analysis of evolution of the endemic wall lizard
Podarcis tiliguerta (Squamata: Lacertidae) from the
Mediterranean Islands of Corsica and Sardinia**

(Título tentativo, fase final de preparación)

En el archipiélago de Córcega y Cerdeña habita el último componente del Clado del Mediterráneo Occidental, *Podarcis tiliguerta*. Cuarenta y un individuos de esta especie, pertenecientes a 13 localidades de Cerdeña, y 15 de Córcega, se analizan con seis fragmentos mitocondriales. También se evalúan especímenes de *Podarcis sicula*, muestreados en cuatro localidades de Cerdeña. Los resultados muestran un gran nivel de diversidad genética intraespecífica, y cinco linajes mitocondriales: tres identificados en Córcega, dividiendo la isla en norte, suroeste y sureste, y dos en Cerdeña: norte de la isla respecto a sur. El origen de la especie se estima hace 20.93–10.73 Ma, próximo al origen estimado de diversidad del género (23.41–12.57 Ma). Un aspecto a resaltar del manuscrito es que recomienda una revisión taxonómica de *P. tiliguerta*, para evaluar si es una especie o un complejo de especies.

Este trabajo se ha titulado provisionalmente “*A multilocus analysis of evolution of the endemic wall lizard Podarcis tiliguerta (Squamata: Lacertidae) from the Mediterranean Islands of Corsica and Sardinia*”, y está siendo revisado por el resto de autores, previo paso a su publicación.

**A multilocus analysis of evolution of the endemic wall lizard
Podarcis tiliguerta (Squamata: Lacertidae) from the
Mediterranean islands of Corsica and Sardinia**

Abstract

Podarcis tiliguerta is a wall lizard endemic to the Mediterranean islands of Corsica and Sardinia, an area classified as a great biodiversity hotspot. High genetic and morphological diversity has previously been documented, which suggested the existence of a species complex for *P. tiliguerta*. Here, we analysed mitochondrial and nuclear markers (mtDNA, 3112 bp; nDNA, 3961 bp) in *P. tiliguerta* sampled from thirty-two localities on Corsica and Sardinia. Five main mtDNA lineages were detected: three groups in Corsica (North, South-East and South-West) and two in Sardinia (North vs. South), whereas only two nDNA groups were detected: Corsica and Sardinia. A time-calibrated Bayesian tree for the principal mitochondrial lineages provided statistical support for a Miocene origin of the *P. tiliguerta* lineage (14.8 Ma, 95% HPD: 20.93–10.73 Ma), not long after our estimate for the origin of the *Podarcis* genus (16.67 Ma, 95% HPD: 23.41–12.57 Ma). Similar divergence times were obtained for nuclear data for *P. tiliguerta* (11.31 Ma, 95%: 15.17–8.08 Ma) and for the divergence origin of the genus (23.19 Ma, 95%: 31.61–15.40). Our results support species complex hypothesis, enunciated previously for *P. tiliguerta*, and expound the need of a taxonomic review.

Key-words: *Podarcis tiliguerta*, Lacertidae, Corsica and Sardinia Islands, mitochondrial DNA, nuclear DNA, species tree

Islands provide many of the world's biodiversity hotspots. They continuously generate new species with the term "speciation machines" (Rosenzweig 1995) used to describe this production. High rates of speciation are facilitated by specific island characteristics that lead to a wealth of ecological, biogeographic and evolutionary processes. These include: natural fragmentation, long term isolation, high altitudes creating habitat heterogeneity, complex intra-island landscapes, and island emergence due to volcanism and eustatic sea-level changes.

The Mediterranean basin was one of the first 25 Global Biodiversity Hotspots to be named (Myers *et al.* 2000) and is characterized by substantial island diversity (Fernández-Palacios 2010). The Tyrrhenian region within the Mediterranean is particularly diverse due to the influence of complex paleogeographical and historical factors (Verlaque *et al.* 1997; Médail & Quézel 1999). It includes Sardinia and Corsica, two of the largest and highest (1834 m and 2710 m, respectively) Mediterranean islands, which are separated by a strait of only 11 km. They contain high degrees of endemism including several hundred endemic plants. The geological history has undoubtedly played a role in generating this diversity. The microplate containing Corsica and Sardinia became isolated from the Iberian plate around 30-28 Ma ago. Subsequent anti-clock wise rotation and disjunction of the two islands began 15 Ma ago and was completed 9 Ma (Alvarez 1972, 1974). During this rotation, a land bridge maintained the connection between the islands and Europe (Meulenkamp & Sissingh 2003). While this land bridge was subsequently lost, connections between the Corsica–Sardinia archipelago and Europe, as well as with North Africa, were re-established during the Messinian Salinity Crisis (MSC; 5.96–5.33 Ma) when the Mediterranean basin desiccated (Krijgsman *et al.* 1999; Duggen *et al.* 2003). Even later connections between the islands of Corsica and Sardinia were temporarily established as a result of smaller changes in sea level, during glacial periods in the Pleistocene. The last contact between the islands took place during the last Glacial Maximum (Grill *et al.* 2007).

The genus *Podarcis* encompasses about 19 species that are widespread across the Mediterranean, where they show many insular forms. *Podarcis tiliguerta* (Gmelin, 1789)

is the endemic lizard that inhabits Corsica and Sardinia. It exhibits a great intraspecific variability in morphological traits, specially colour pattern and melanism, the latter peculiar of some small island populations (Lanza 1972; Lanza & Brizzi 1974; Brizzi & Lanza 1975; Lanza 1976; Lanza & Brizzi 1977; Lanza & Poggesi 1986; Arnold & Ovenden 2002), which has led to the description of the several microinsular subspecies (Lanza & Corti 1996; Corti & Lo Cascio 2002). Morphological (Bruschi *et al.* 2006; Bruschi *et al.* 2010) and genetic studies based on electrophoretic markers (Capula 1996) and on mitochondrial sequences (Pinho *et al.* 2004; Harris *et al.* 2005; Podnar & Mayer 2005) have evidenced the existence of two or possibly three genetic clusters within the Corsica-Sardinia archipelago. These clusters appear genetically much more divergent than has been detected within some other insular *Podarcis* species such as *P. pityusensis* (Rodríguez *et al.* 2013) or even *P. lilfordi* (Brown *et al.* 2008). The underlying reasons for this divergence remain unexplained but the existence of a species complex has been suggested for *P. tiliguerta* (Harris *et al.* 2005; Bruschi *et al.* 2006), similar to that seen in *P. hispanica* from the Iberian peninsula (Pinho *et al.* 2006) and *P. erhardii* from Greece (Poulakakis *et al.* 2003).

The main objective of this study was to provide a more definitive analysis of the patterns and causes of genetic diversity in *P. tiliguerta* from Corsica and Sardinia (and some offshore islets) using both mitochondrial (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA) markers. The principal features of the evolutionary history that we examine are number of lineages, timing of divergence of these lineages and relationships with other *Podarcis*. In addition, we investigate the historical biogeography of the *P. tiliguerta* lineage and examine possible processes that may have given rise to the current patterns.

Material and methods

Samples and DNA isolation

Forty-one *Podarcis tiliguerta* were captured by noosing, under official licenses. The *P. tiliguerta* specimens were from 15 localities in Corsica, 13 localities in Sardinia and four offshore islands and islets (Figure 1 and Table 1). We also sampled four *Podarcis sicula* specimens (Fig. 1, 24-Locanda dil Parco, 33-Villaggio Medioevale di Geridu, 34-Nuraghe Saint Tu Antine, 35-Area Paleocristiana di Cornus), corresponding to *P. s. cettii*. Tissue samples from several other key *Podarcis* species were available from previous

work (*P. muralis*, *P. hispanica*, *P. vaucheri* and *P. carbonelli*) and were sequenced and analysed to improve divergence time estimation analyses for *P. tiliguerta* (see appendix 1). Tail-tips were removed before releasing the individual at the site of capture, and tissue samples were stored in 100% ethanol. A standard phenol-chloroform protocol was used for DNA extraction (Sambrook *et al.* 1989).

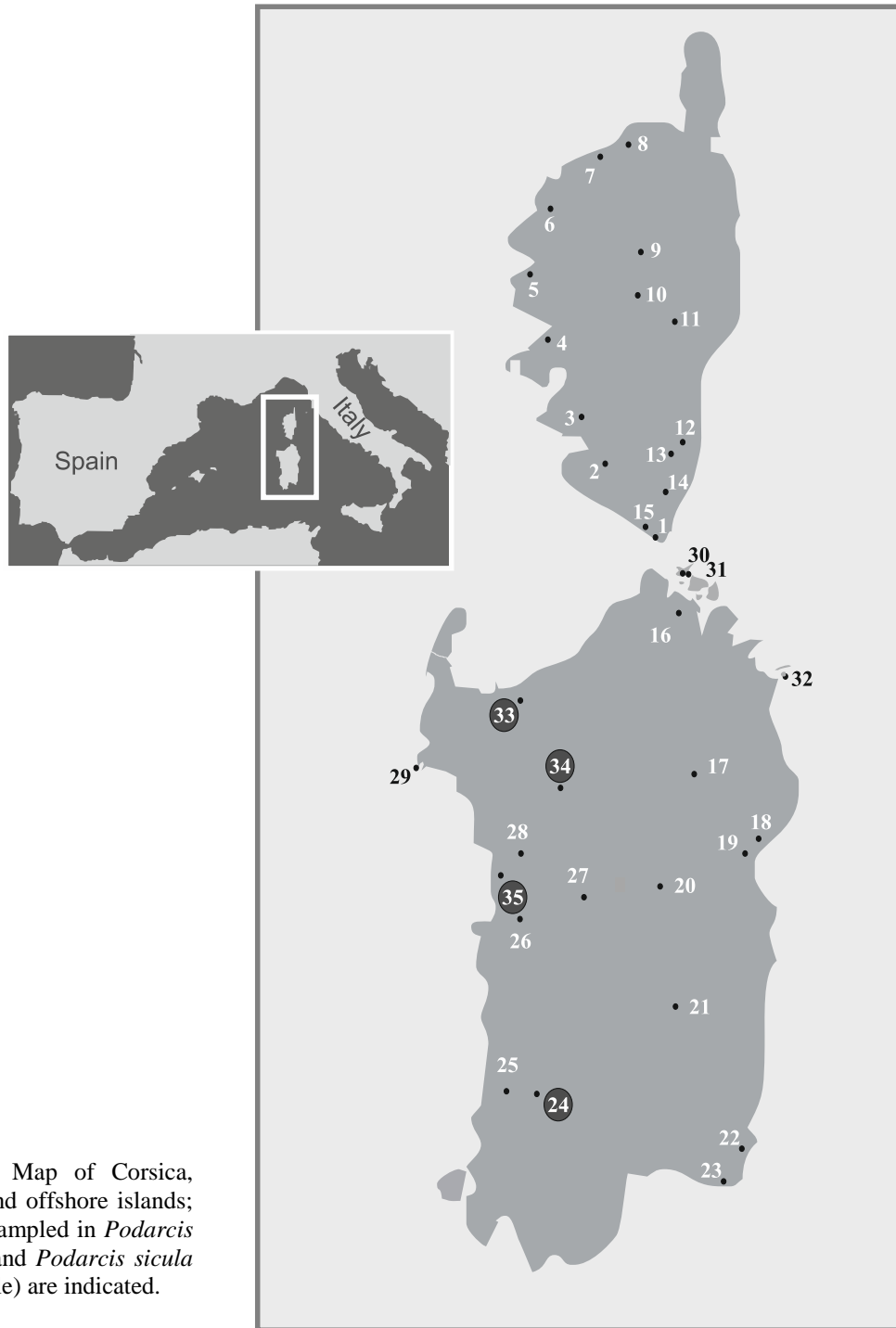


Figure 1. Map of Corsica, Sardinia and offshore islands; localities sampled in *Podarcis tiliguerta* and *Podarcis sicula* (black circle) are indicated.

Table 1: Localities and *P. tiliguerta* specimens sampled.

Localities	Samples
Corsica Island	
1 Bonifacio	TCO-1/17
2 Sartène	TCO-2
3 Filitosa	TCO-3
4 Sant Bastiano (Calcatoggio)	TCO-4
5 Les Chalanches (Piana)	TCO-5
6 Casa Vecchia (Calvi)	TCO-6
7 L'Île Rousse	TCO-7
8 Pietra Moneta	TCO-8
9 Corte	TCO-9/18
10 Vivario	TCO-10
11 Ghisonaccia	TCO-11/19
12 Ribba (San Cavino Di Carbini)	TCO-12
13 Casteddu d'Araghju (Lecci)	TCO-13
14 Chera (Sotta)	TCO-14
15 La Trinité (Bonifacio)	TCO-20/21
Sardinia Island	
16 Gallura	TSA-3
17 Romanzesu (Bitti Nuoro)	TSA-1
18 Dorgali (Nuoro)	TSA-11
19 Su Gologone (Oliena Nuoro)	TSA-10
20 Fonni	TSA-5
21 Flumendosa lake (Cagliari)	TSA-13
22 Costa Rei (Cagliari)	TSA-19
23 Villasimius (Cagliari)	TSA-12/18
24 Locanda dil Parco (Viacidro)	TSA-15
25 Fluminimaggiore	TSA-20
26 Narbolia (Oristano)	TSA-17
27 Nuraghe Sorradile (Oristano)	TSA-2
28 Nuraghe Nuradeo	TSA-4
Sardinian islands and islets	
29 Foradada Island (Alghero Sassari)	Tf-1-3
30 Paduleddi islet (La Maddalena archipelago)	Tp-1-3
31 Stramanari islet (La Maddalena archipelago)	Ts-1
32 Molara Island	TSA-8

Amplification and sequencing

Six non-overlapping mtDNA fragments were amplified and sequenced for each specimen containing sequences from the following genes: (i) partial 12S rRNA, (ii) partial tRNA_{Glu} and partial cytochrome *b* (*cytb*), (iii) partial *cytb* and partial tRNA_{Thr}, (iv)

partial control region, (v) two partial subunits of the NADH dehydrogenase gene and associated tRNAs (referred to as ND1, ND2, tRNA_{Ile}, tRNA_{Gln}, and tRNA_{Met}), (vi) partial 16S rRNA. Primers and amplification conditions are the same as those used in our previous studies of *Podarcis* (Terrasa *et al.* 2009; Rodríguez *et al.* 2013; 2014)(see Appendix 1), with the exception of the light strand primer (L14143; see Appendix 2) for amplification of fragment (ii) (above) in the Sardinian specimens. The 16S rRNA primers were obtained from Carranza, *et al.* (1999).

Six partial nuclear genes (NCPLs) were sequenced: (i) melanocortin 1 receptor gene (*MC1R*), (ii) recombination-activating gene 1 (*RAG-1*), (iii) lipoprotein gene *APOBE28* and (iv) lipoprotein gene *BLC9L*, (v) transcription factor gene *KIAA2018* and (vi) kinesin family member *KIF24*. Primers are described in Appendix 2.

Both strands were sequenced on an automated ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using a BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and edited and aligned using BioEdit v.7.0.5.2 (Hall 1999).

Data analysis

DnaSP v.5.10.01 (Librado & Rozas 2009) was used to obtain basic genetic diversity indices, test neutrality and phase nuclear data. Potential recombination events were assessed using the Pairwise Homoplasy Index (phi) test (Bruen *et al.* 2006) implemented in SplitsTree v. 4 (Huson & Bryant 2006).

Analysis of molecular variance (AMOVA) (program: Arlequin v.3.1.1; Excoffier, *et al.* 2005) was used to examine genetic structuring between primary geographic groups (Corsica vs. Sardinia and Sardinian islands). BAPS v.5.3 (Corander *et al.* 2003) was used to infer population structure. The number of clusters was determined and then admixture analyses were executed to infer the ancestral source of the samples (no prior information on geographic location was used). Relationships between nuclear DNA haplotypes were explored using statistical parsimony networks, with a 95% connection limit (program: TCS v.1.21; Clement, *et al.* 2000).

Species phylogeny and divergence times

The multispecies coalescent approach implemented in *BEAST v. 1.7.4 (Heled and Drummond 2010; Drummond *et al.* 2012) was used to estimate divergence times and phylogenetic relationship between the main *P. tiliguerta* mitochondrial lineages, identified by BAPS. The method allows estimation of divergence times while taking into account within-population ancestral polymorphism. We included related *Podarcis* lineages from previous studies to allow incorporation of time-calibrated nodes into the analysis (Brown *et al.* 2008; Rodríguez *et al.* 2013; 2014). Eighteen *Podarcis* groups were treated as “species” in the analysis: (i) *P. lilfordi* Menorca, (ii) *P. lilfordi* West Mallorca, (iii) *P. lilfordi* N & S Mallorca & N Cabrera, (iv) *P. lilfordi* South Cabrera and (v) *P. lilfordi* Cabrera (see Brown *et al.* 2008; two sequences for group, GenBank accession numbers: EF694760–62, EF694764–66, EF694771, EF694773–75, EF694782, EF694785, EF694787–88, EF694799, EU006728, EU006730, EU006734, EU006738, EU006743, EU006745, EU006753, EU006756, EF694797, EF694799, EF694802, EF694805, EF694807, EF694809–10, EF990517, EF990522, EF990525, EF990531, EF990536, EF990540–41, EF990545–46, KC623944); (iv) *P. pityusensis* Formentera, Freus islands and Ibiza and (vii) *P. pityusensis* Ibizan islands (see Rodríguez *et al.* 2013; GenBank accessions: EF694768–69, EF694794–95, EU006725–26, EF694814–16, EF990552, EF694827–28, JX852045–JX852108, JX852118–JX852137); (viii) *P. filfolensis* Malta, and (ix) *P. filfolensis* Gozo, Comino, Cominotto and Small Blue Lagoon Rock (see Rodríguez *et al.* 2014; GenBank accessions: JX852109, JX852112, JX852115, JX852138 and KF022049-79); (x) *P. tiliguerta* North Corsica, (xi) *P. tiliguerta* South-West Corsica, (xii) *P. tiliguerta* South-East Corsica, (xiii) *P. tiliguerta* North Sardinia and offshore islands, (xiv) *P. tiliguerta* South Sardinia, (xv) *P. muralis*, (xvi) *P. hispanica*, (xvii) *P. vaucheri* and (xviii) *P. carbonelli*.

The mtDNA sequences were divided into eight partitions and suitable models of DNA substitution identified using jModeltest v.0.1.1 (Posada 2008), following AICc (Akaike Information Criterion corrected for small samples): (i) 12S rRNA, (ii) control region, (iii) all tRNAs, (iv) 1st and 2nd codon positions of the ND1/ND2 sequences, (v) 3rd codon position of ND1/ND2, (vi) 1st codon position of cytb, (vii) 2nd codon position of cytb, (viii) 3rd codon position of cytb. When the “best” model was not available in *BEAST, we used the next most complex model.

A strict clock model was used in *BEAST and the tree prior specified by a Yule process. We applied a time calibration on the most recent common ancestor (MRCA) of all *P. lilfordi* and *P. pityusensis* lineages, specified by the Normal distribution $N(5.325, 0.0001)$. This calibration is based on the abrupt separation of the two Balearic Island groups at the end of the Messinian Salinity Crisis and its use has been justified previously (see Brown *et al.* 2008 and Rodríguez *et al.* 2013 for more details). The time of the MRCA of all *P. pityusensis* was loosely constrained using the Gamma distribution as $G(5.8, 0.2)$ and the MRCA of *P. lilfordi* was loosely constrained as $G(3.48, 0.5)$ to provide a slightly greater prior density around the posterior divergence times obtained in our previous analyses (Brown *et al.* 2008; Rodríguez *et al.* 2013; 2014).

The MCMC chain was run for 200 million generations, sampling every 10,000 steps. Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond 2007) allowed visual inspection of posterior samples. TreeAnnotator (BEAST package) was used to combine and analyse the posterior tree samples at stationarity (trees were combined using the maximum sum of clade credibilities criterion).

Models of DNA evolution for nuclear loci were also assessed using jModeltest v.0.1.1 (Posada 2008). Nuclear gene trees were estimated using BEAST (Heled and Drummond 2010) for phased sequences obtained from *P. tiliguerta*, *P. hispanica*, *P. filfolensis*, *P. lilfordi* and *P. pityusensis* (GeneBank accession pending). As for mtDNA, a time calibration was applied to the (*P. lilfordi*, *P. pityusensis*) node ($N(5.325, 0.0001)$); with the best substitution model for each locus and following a strict clock model and Yule process (MCMC; 100 million steps, sampling every 10,000).

Results

Mitochondrial data

Total concatenated fragment lengths were 3112 bp (12S rRNA 392 bp, the control region 497 bp, ND1 85 bp, ND2 510 bp, cytochrome b 929 bp, tRNAs 256 bp, 16S rRNA 431 bp). Sequences have been deposited in GenBank (accession numbers KM058760–KM058886). Two haplotypes from 12S rRNA and the control region matches with previously deposited in GenBank (JX852116–17, JX852110–11). There were 646 polymorphic sites, giving rise to 37 different haplotypes, which differed by a mean

pairwise difference of 216.09 (\pm 92.03). Indices of mtDNA diversity (Table 2; analyses without 16S rRNA sequences) were higher in *P. tiliguerta* than corresponding values for related species (Terrasa *et al.* 2009; Rodríguez *et al.* 2013; 2014) and demographic stability is suggested by non-significant neutrality test (Tajima's D and Fu's Fs).

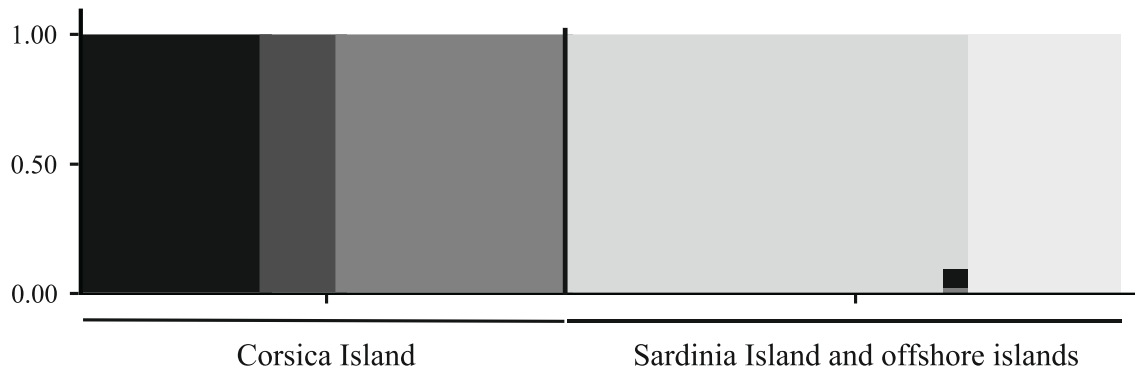
Sequences from other *Podarcis* species, analysed in this work, have been deposited in GenBank: *P. sicula* (pending), *P. muralis* (pending), *P. vaucheri* (pending), *P. carbonelli* (pending) and *P. hispanica* (pending). All four *P. sicula* specimens from Sardinia presented different haplotypes, with 88 variable sites and a mean pairwise difference of 57.3 (\pm 22.94). Sequences from *P. tiliguerta* and *P. sicula* shared 63 mutations and presented an average number of 290.8 nucleotides differences between them.

The AMOVA partitioned the variance as 51.01 % between Corsica and Sardinia (and offshore islands) and 48.99 % within these regions ($F_{ST}=0.51$). BAPS analysis of the mtDNA locus defined five genetic clusters ($\ln L=-8303.607$ with 16S rRNA sequences and $\ln L=-7492.893$ without 16S rRNA sequences) (Fig. 2A). The analysis distinguishes three Corsican groups: cluster A includes lizards from the south-western region (TCO2–4), cluster B includes lizards from the south-east (TCO1, 12–14, 17, 20–21), and cluster C contains lizards from the north of Corsica (TCO5–11, 18–19). Two Sardinian clusters are identified: cluster E contains *P. tiliguerta* from Sardinian islands and islets (Molara island, Foradada island, Paduleddi islet and Stramari islet) and from the north of the main island (TSA1–5, 10–11, 17), and cluster D includes all remaining specimens (TSA12–13, 15, 18–20), corresponding to localities in the south of the island.

Nuclear data

Lengths of the nuclear loci were: *MC1R* (720 bp), *RAG-1* (939 bp), *APOBE28* (489 bp), *BLC9L* (627–636 bp), *KIAA2018* (644–659 bp) and *KIF24* (497–518 bp). Sequences have been deposited in GenBank, accession numbers pending for *P. tiliguerta* and for *P. sicula*. Basic genetic diversity indices and neutrality statistical tests are indicated in Table 3. The phi test (Bruen *et al.* 2006) showed no statistically significant evidence for recombination in any gene: *MC1R* ($p = 0.164$), *APOBE28* ($p = 0.369$), *KIAA2018* ($p = 0.095$), *BLC9L* ($p = 0.467$), *KIF24* ($p = 0.322$), *RAG-1* ($p = 0.193$).

A) Mitochondrial data



B) Nuclear data

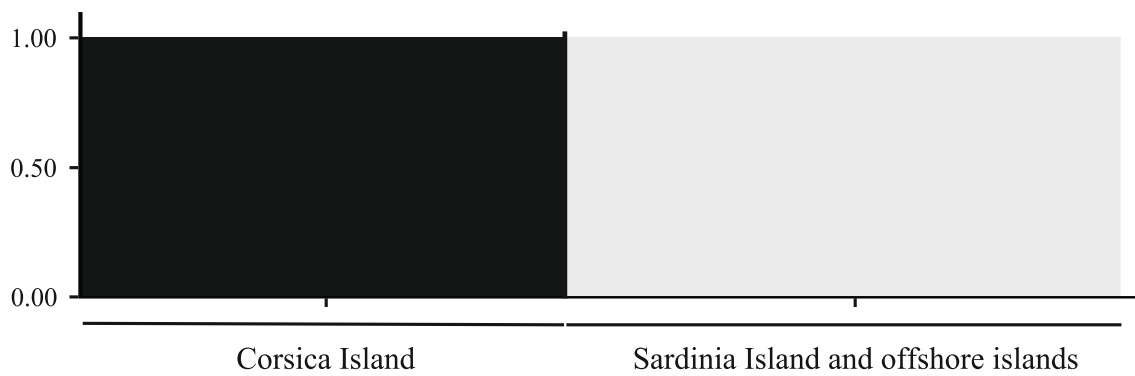


Figure 2. Genetic structure inferred from mtDNA and nDNA for the two main geographic regions used in this study. Mixture analyses were estimated by BAPS software. In the Bar plot, vertical bars represent individuals and proportions of admixture, with different colours corresponding to different ancestral sources. Five clusters were identified with mitochondrial data (A), while nuclear data (B) evidenced two clusters.

Table 2: Diversity parameters for the concatenated mtDNA fragment in *P. tiliguerta* (without 16S rRNA sequences) compared with others species of the Wester Islands Group (*P. lilfordi*, *P. pityusensis* and *P. filfolensis*).

Species	N°	V	N° hap	Nucleotide diversity	K	Fu's Fs (1997)	Fu and Li's D (1993)	Fu and Li's F (1993)	Fay and Wu's H (2000)	Tajima's D (1989)
<i>P. lilfordi</i> ^a (2382 bp)	117	189	62	0.019±0.005	45.067±19.503	-1.129 ^{ns}	0.652 ^{ns}	0.860 ^{ns}	-17.572 ^{ns}	0.770 ^{ns}
<i>P. pityusensis</i> ^b (2430 bp)	73	90	60	0.004±0.001	9.083±4.17	-56.983***	-2.432**	-2.589**	-25.341**	-1.745*
<i>P. filfolensis</i> ^c (2533 bp)	31	41	20	0.004±0.001	9.355±4.27	-4.097*	-0.681 ^{ns}	-0.668 ^{ns}	-12.409**	-0.325 ^{ns}
<i>P. tiliguerta</i> (2681 bp)	41	595	37	0.074±0.003	197.126±83.979	0.840 ^{ns}	1.419 ^{ns}	1.425 ^{ns}	-12.209 ^{ns}	0.792 ^{ns}

N°, number of individuals sampled; V, variable position; N° hap, number of haplotypes; K, average number of pairwise differences;

^{ns} not significant; *P<0.1; ** P<0.05; ***P<0.001.

^{a,b,c} obtained from data in Terrasa et al. 2009^a, Rodríguez et al. 2013^b and Rodríguez et al. 2014^c

Table 3: Diversity parameters for each nuclear gene, and the concatenated fragment in *P. tiliguerta*.

Gene	N°	V	A	k	Nucleotide diversity	Fu's Fs	Fu and Li's D	Fu and Li's F	Fay and Wu's H	Tajima's D
<i>MC1R</i> (720 bp)	39	47	56	4.08	0.006±0.001	0.246 ^{ns}	-0.147 ^{ns}	-0.132 ^{ns}	0.350 ^{ns}	-0.064 ^{ns}
<i>RAG1</i> (939 bp)	38	70	52	6.05	0.006±0.001	0.301 ^{ns}	-0.098 ^{ns}	-0.133 ^{ns}	0.128 ^{ns}	-0.061 ^{ns}
<i>APOB E28</i> (489 bp)	37	47	41	2.96	0.006±0.001	0.440 ^{ns}	-0.074 ^{ns}	-0.006 ^{ns}	0.101 ^{ns}	-0.080 ^{ns}
<i>BLC9L</i> (618 bp)	38	66	54	5.11	0.008±0.001	-0.128 ^{ns}	-0.134 ^{ns}	-0.116 ^{ns}	-0.259 ^{ns}	-0.099 ^{ns}
<i>KIAA2018</i> (632 bp)	39	71	66	13.00	0.021±0.001	-0.264 ^{ns}	-0.116 ^{ns}	-0.177 ^{ns}	0.134 ^{ns}	0.073 ^{ns}
<i>KIF24</i> (488 bp)	39	75	55	10.45	0.021±0.001	-0.115 ^{ns}	-0.096 ^{ns}	-0.142 ^{ns}	0.382 ^{ns}	-0.097 ^{ns}
Concatenated (3961 bp)	37	377	77	41.55	0.011±0.001	-0.752 ^{***}	-0.145 ^{ns}	-0.157 ^{ns}	1.733 ^{ns}	-1.683 ^{ns}

N°, number of individuals sampled; V, variable position; A, alleles; K, average number of pairwise differences;
^{ns} not significant; ***P<0.001

Length polymorphisms were detected in three nuclear genes. *KIAA2018* included a polymorphic microsatellite (STR) with CCT repeats ranging from 4 to 10, and (CCT)₇ being most frequent (see appendix 3). STR detected within the *BLC9L* sequence is highly polymorphic in Sardinia and offshore islets, but not in Corsica, and present a (CAG)₃ (CMR)_a (CCD)_b (CCT) (CAG)₃ (CAA)₂ motif, where “a” ranged between 0 and 1 and “b” between 3 and 5 repeats. Besides, three different INDELS were detected in *KIF24* sequences: (i) a 9 bp deletion (TSA-5) and (ii) a 12 bp insertion (AAGGACTTTGGG; in TSA-1–3, TSA-5, TSA-13, Tf-1–2), both in Sardinian individuals and (iii) significant 6 bp deletions in Corsican samples (TCO-6, TCO-9 and TCO-10).

AMOVA showed an 18.2 % of variance between Corsica and Sardinia (and offshore islands) and an 81.8 % within these regions ($F_{ST}= 0.182$). Two genetic clusters were defined by a BAPS analysis of concatenated nDNA ($\ln L= -5640.911$), the first including all Corsican individuals and the second with Sardinian and islets offshore specimens (Fig. 2B).

Two genes (*APOB E28* and *MC1R*) show classical star-like networks, with a main haplotype shared by Corsican and Sardinian samples, and derived haplotypes belonging to both islands (Figure 3). In contrast, *BLC9L* and *RAG1* show compound star-like networks: and in both cases there are two main haplotypes, separated by one mutational step, corresponding to Corsica and Sardinia. Finally, the other two networks (*KIAA2018* and *KIF24*) exhibit a clear separation between Corsican and Sardinian samples, together with a much higher differentiation between haplotypes, which exceeds thirty mutational steps. Corsican samples show greater diversity at all loci

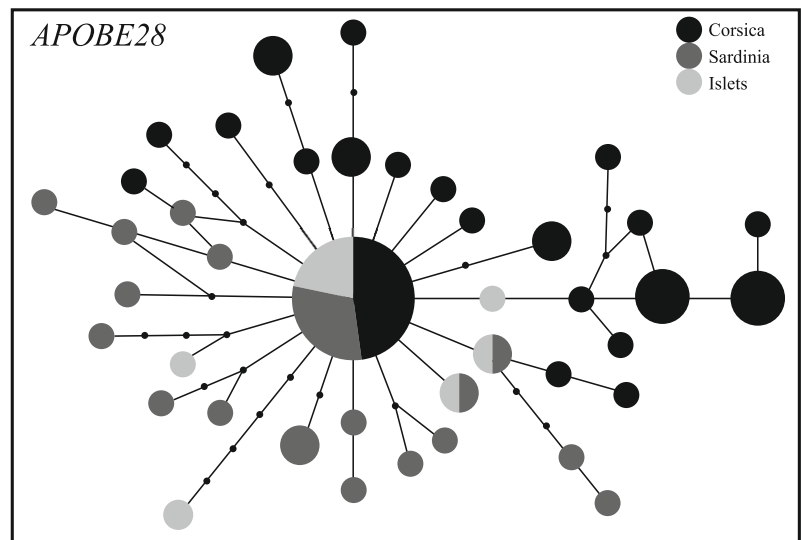
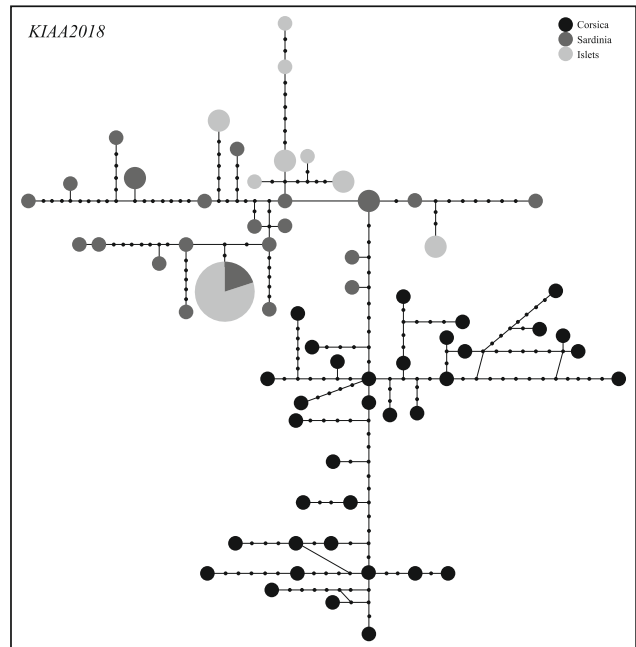
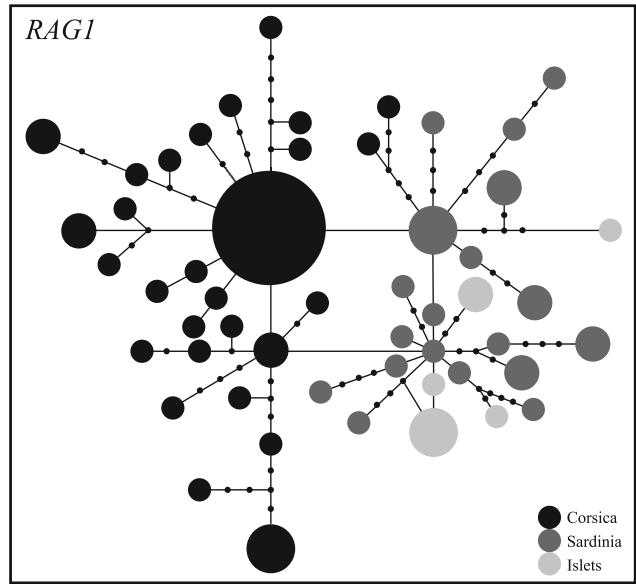
Species phylogeny and divergence times

Both gene trees and species trees exhibit strong posterior support ($P=1.00$) for the most basal node. The ancestral node for all *Podarcis* species was dated at 16.67 Ma (95% highest posterior density, HPD: 23.41–12.57 Ma) in the mtDNA species tree (Fig. 4) and at 23.19 Ma (95% HPD: 31.61–15.41 Ma) for the nuclear data, in the gene tree (Fig. 6). The mean posterior divergence time between the five mitochondrial lineages was 13 Ma (95% HPD: 18.83–8.58 Ma) and ancestral nodes for Sardinian and Corsican populations were dated at 10.61 Ma (95% HPD: 16.41–3.46 Ma) and 8.51 Ma (95% HPD: 13.01–3.5

Ma), respectively (Fig. 4). Whereas nuclear gene tree estimated the origin of *P. tiliguerta* at 9.79 Ma (95% HPD: 13.26–6.98 Ma) and Corsican and Sardinian lineages were definitely isolated at 8.86 Ma (95% HPD: 11.81–6.11 Ma) and at 8.29 Ma (95% HPD: 11.21–5.7 Ma), respectively. The mitochondrial DNA genealogies for *P. tiliguerta* are shown in Fig. 5.

Discussion

This study has detected high levels of genetic variability in *Podarcis tiliguerta*. This has already been suggested by some previous studies (i.e. Capula, 1996, Harris *et al* 2005). Other insular Mediterranean species, such as *P. pityusensis* or *P. lilfordi* and *P. filfolensis* show lower levels of divergence, though inhabit smaller islands. For example, the average number of pairwise differences in mtDNA is more than four times higher in *P. tiliguerta*, than *P. lilfordi*, and is almost 22 times greater than *P. filfolensis* or *P. pityusensis* (Table 2). As well, nDNA variability in *P. tiliguerta* (Table 3; nucleotide diversity: 0.011 ± 0.001 ; K: 41.548) is lower than the found in their own mitochondrial fragment (Table 2; nucleotide diversity:



0.074±0.003; K: 197.126±83.979), but higher than levels observed in mtDNA for *P. filfolensis* or *P. pityusensis* (Table 2).

Our second major finding is the strong genetic structure detected in *P. tiliguerta*, with a deep differentiation between Corsican and Sardinia lineages. Five main genetic groups were detected within mtDNA, and only two by nuclear genes. Previous studies (Capula 1996; Harris *et al.* 2005) using allozyme or short fragments of mtDNA showed that Corsica and Sardinia samples formed two genetic groups. Later analyses based on slightly wider sampling revealed three mtDNA lineages: two in Sardinia and one in Corsica (Podnar & Mayer 2005; Vasconcelos *et al.* 2006). Here, mtDNA variation, identified in our analyses, permits that Corsica can be subdivided in three groups: north, south-east and south-west of the island, and Sardinia in two lineages, one including satellite islands and individuals from the north of the main island, and the other corresponding to specimens from the south. While our nuclear data, with a minor degree of variability, revealed only two clusters, coincident with Corsican and Sardinian

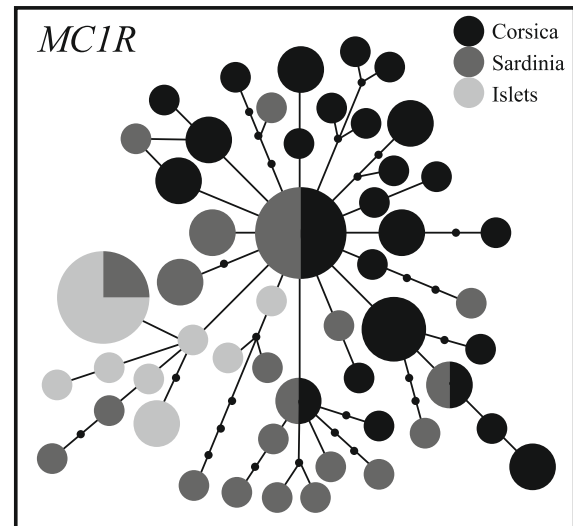
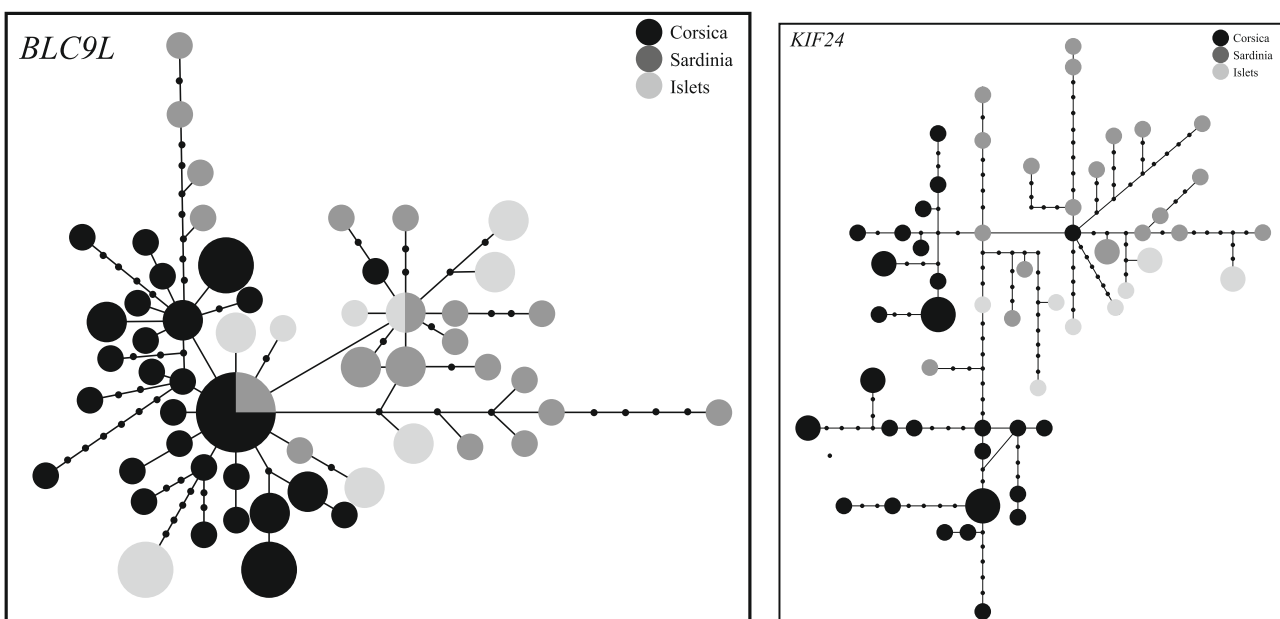


Figure 3. Nuclear haplotype networks for *Podarcis tiliguerta*.



specimens. Mitonuclear discordance could be explained by incomplete lineage sorting of nuclear loci, due to nDNA complete this process slower than mtDNA (Funk & Omland 2003; Toews & Brelsford 2012) or may also be attributed to hybridization or introgression (Toews & Brelsford 2012). Signs of a nuclear introgression are observed in the nuclear tree (Fig. 6), since, in some cases, each sequences from a single individual are distributed in different clades. Bruschi *et al.* (2006) suggested at morphological level hybridization in southern Corsican populations with introduced Sardinian specimens. While our BAPS results with both markers (Fig. 2) do not support this finding, keeping specimens from Corsica and Sardinia well separated. *P. tiliguerta* coexist with *P. sicula*, especially in Sardinia, where both species shared the same habitats, although having morphological and ecological differences. When specimens from the sympatric lizard *P. sicula* were incorporated to mitochondrial *BEAST analyses (as nineteenth population in the population tree), they clustered together with *P. tiliguerta* specimens (data not shown), as well as *P. sicula* specimen from GenBank (accession number NC_011609), but with weak posterior support (P=0.38). So, a possible hybridization or introgression between both species cannot be discarded. In nuclear genes, some shared alleles between Corsica and Sardinia are evident and punctual alleles also are shared with *P. sicula*, for example the allele 7 in the STR included in *KIAA2018* (appendix 3), this fact jointly with the similarly high frequency of this allele in *P. tiliguerta* suggests that it represents an ancestral state.

The ancestral species node for *P. tiliguerta* was dated at 13 Ma (Fig 4; 95% HPD: 18.83–8.58Ma) with mitochondrial data in the population tree, confirming preliminary divergence time estimates (13 Ma) (Oliverio *et al.* 1998). *P. pityusensis*, *P. lilfordi* and *P. filfolensis* are the most related species to *P. tiliguerta*, including all them in the named “Western Islands group” (Harris & Arnold 1999). While intraspecific divergence in *P. lilfordi* were dated in the early Pleistocene (Brown *et al.* 2008), in *P. filfolensis* in the Pleistocene (Rodríguez *et al.* 2014) and *P. pityusensis* in the mid-late Pleistocene (Rodríguez *et al.* 2013), *P. tiliguerta* divergence was originated in the Miocene, close to the MRCA (Fig 4; 16.67 Ma, 95% HPD: 23.41–12.57 Ma). *P. tiliguerta* derive, as a consequence of allopatric speciation, from continental ancestors that colonized the Corsica-Sardinia microplate. Genus divergence (around 17 Ma) is posterior to the microplate isolation from the Iberian plate (29 Ma), so probably ancestors reached it afterwards, through the land bridge maintained with the continent during rotation. Later,

the microplate split in the two islands (15–9 Ma ago; Alvarez, 1972; 1974), initiating the foundation of the Sardinian (10.61 Ma; 95% HPD: 16.41–3.46 Ma) and Corsican lineages (8.51 Ma; 95% HPD: 13.01–3.50 Ma), so geological events affected intraspecific divergence. Nevertheless, heterogeneous orography of Corsica and Sardinia could play an important role in determine intraspecific diversity. About two-third of Corsica surface are comprise by mountains, forming a chain that runs in a north-south direction; its topography determine a wide range of climates (Mouillot *et al.* 2008). Whereas Sardinia consist in a variety of landscapes: isolated groups of mountains, hilly lands, plateaus and a few plains (Pungetti *et al.* 2008). Tyrrhenian landscape could act as a barrier to genetic flow and together with the adaptation to local characteristics led to the divergence into different lineages. Already, Capula (1996) found that the *P. tiliguerta* genetic structure is moulded by the interplay of stochastic processes (geographic isolation, genetic drift) and local bioclimatic regimes.

The time resolution of the most recent events is limited in nDNA analyses (Templeton 2006), because this marker is characterized by an effective population four times larger than mtDNA, and a nucleotide substitution rate lower. Mitochondrial DNA attributes make it a good marker in biogeography, but present the inconvenient that only reflects maternal history. In our work, *P. tiliguerta* divergence using a nuclear gene approach is dated at 9.79 Ma compared with mitochondrial analyses that estimated at 13 Ma. Whereas, main lineages divergence is dated at 8.29 Ma in the case of Sardinian (mtDNA: 10.61 Ma) and at 8.86 Ma (mtDNA: 8.51) in Corsican lineage. Discordance between both dating is the result of (i) dataset analysed, two different markers each one with their own characteristics, and (ii) strategy used to resolve the tree and infer the divergence. So, we compare estimates of a population tree reconstructed with mitochondrial data (following species tree methodology) respect to a gene tree inferred with nuclear data. Taken together, these results illustrate that the history of some genes and the history of the species (in our case populations) may be dissonant, being lineage sorting the causable of this incongruence in the majority of cases, as in the mitonuclear structure discordance.

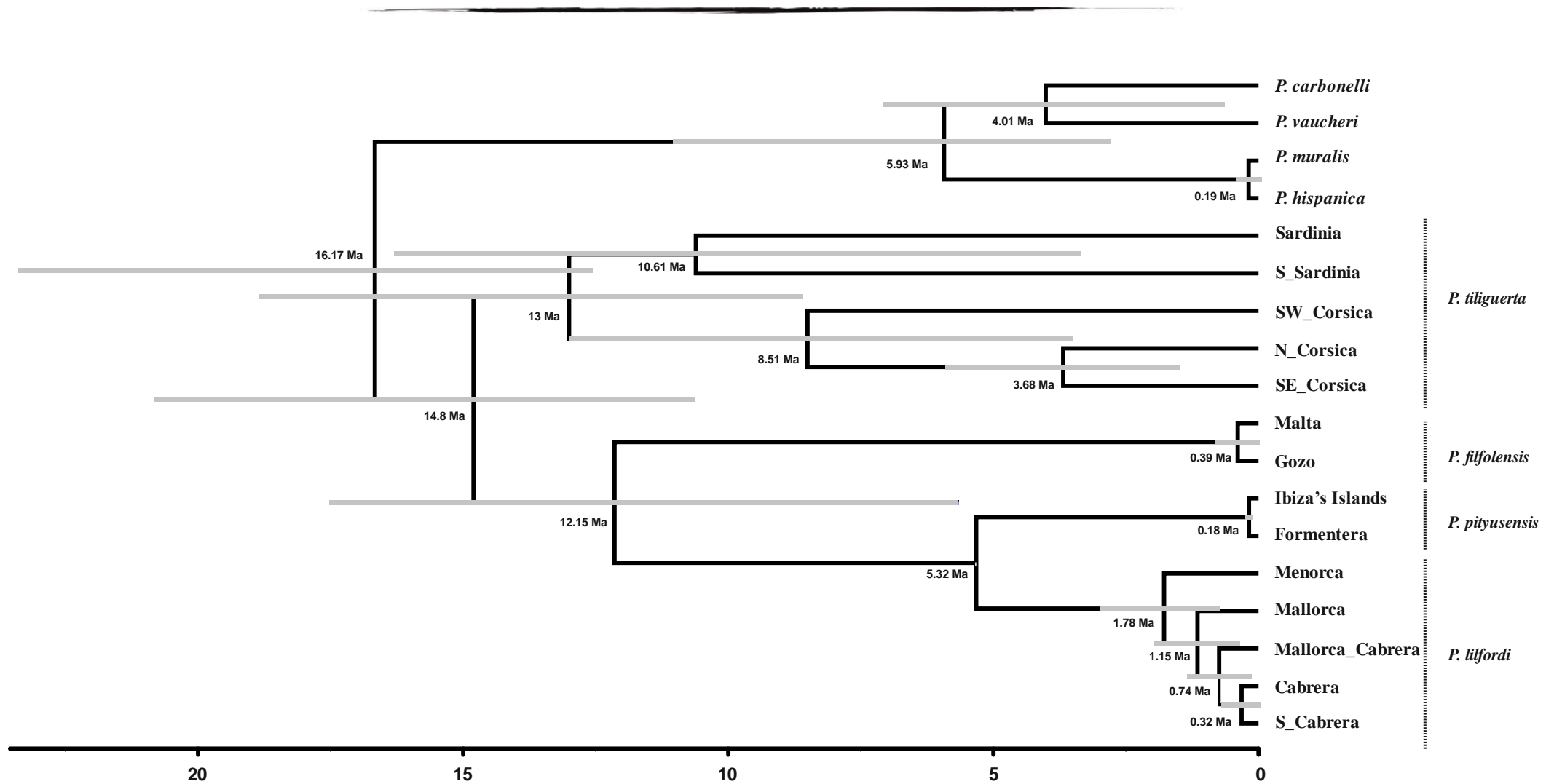


Figure 4. Mitochondrial populations tree chronogram estimated by *BEAST. *P. tiliguerta* lineages corresponded to clusters assigned by BAPS software (Fig. 2A). *P. lilfordi*, *P. pityusensis* and *P. filfolensis* lineages are those identified by Brown *et al.* (2008), Rodríguez *et al.* (2013, 2014). Grey bars correspond to the 95% highest posterior density intervals for each divergence time.

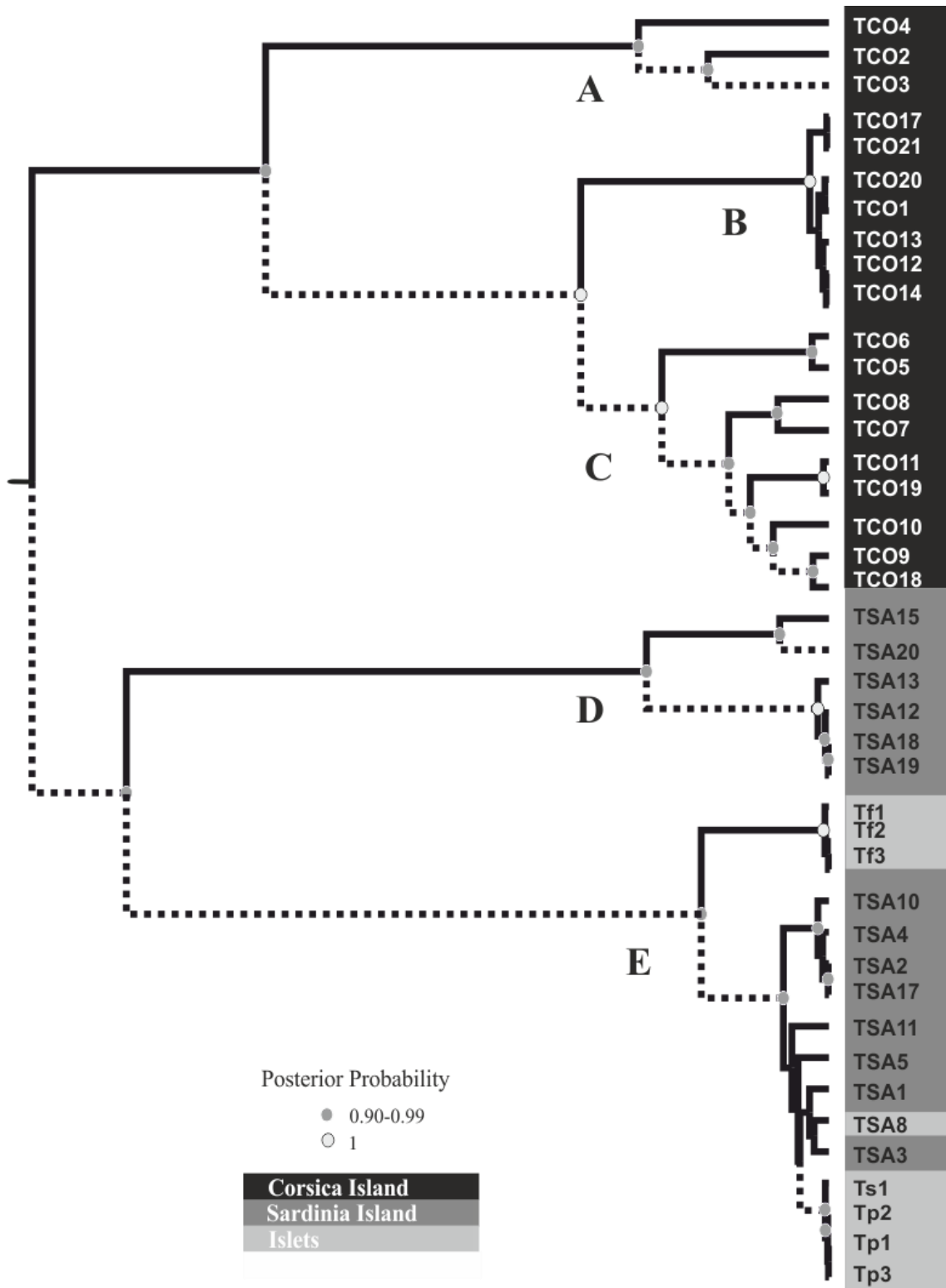


Figure 5. MtDNA phylogenetic tree estimated by *BEAST showing relationships among *P. tiliguerta* haplotypes. Principal clusters (A, B, C, D, E), geographical localization of each specimen and Bayesian posterior probabilities (> 0.9) are indicated on the tree.

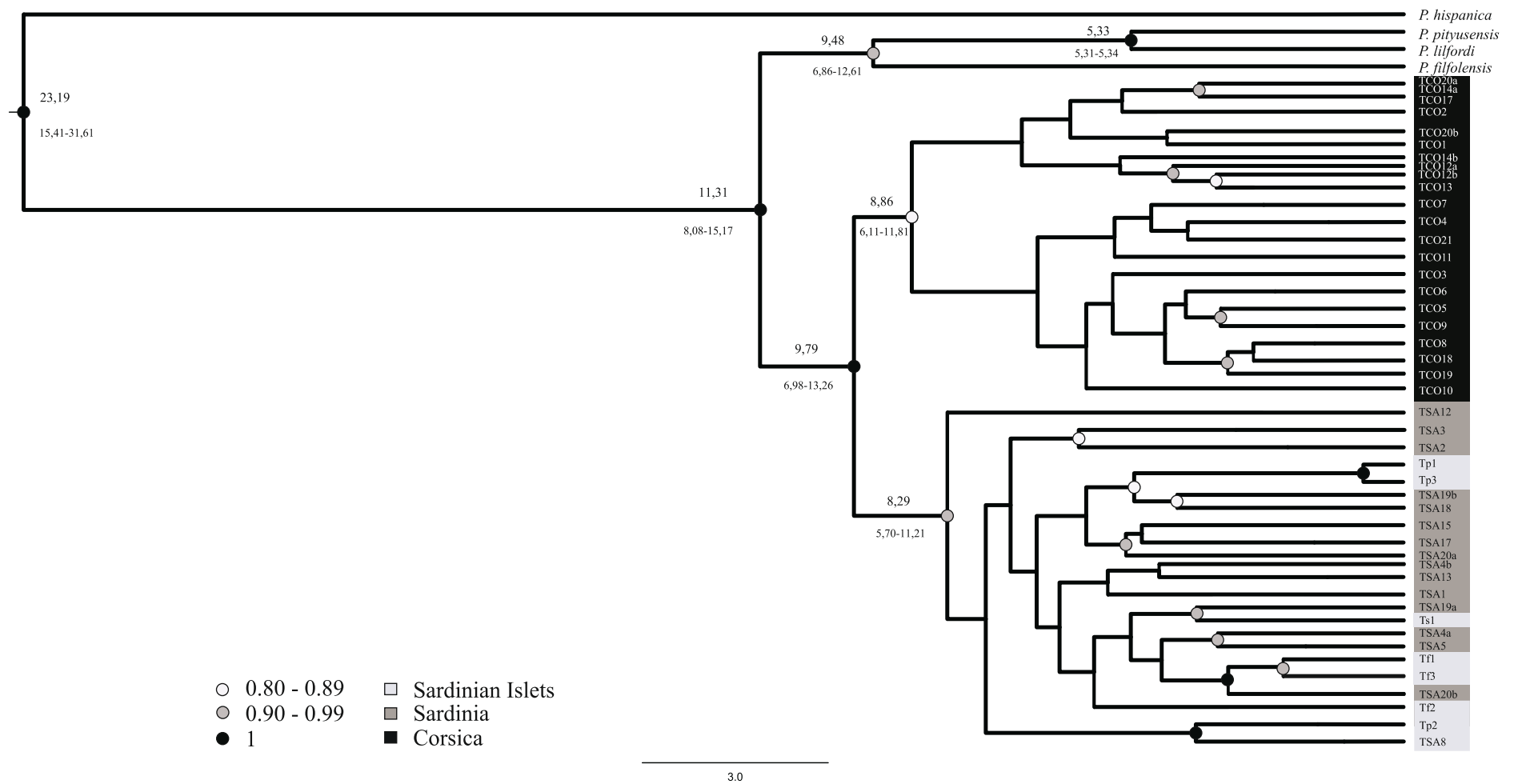


Figure 6. Nuclear DNA phylogenetic tree estimated by BEAST showing relationships among *P. tiliguerta* haplotypes. Geographical localization of each specimen, Bayesian posterior probabilities (> 0.9) and divergence times are indicated on the tree (Ma).

In summary, we analysed *P. tiliguerta* with mitochondrial and nuclear data at various levels: variability, structure and history, concluding that it is a species with high genetic variability and a deep genetic structure, which began to diverge in the Miocene, shortly after the origin of the genus. In light of these results, specially the identification of Corsican and Sardinian as main lineages by clustering analysis with both markers, and the great variability found, greater than their related species (*P. lilfordi*, *P. pityusensis* and *P. filfolensis*), our analyses suggest that the species complex hypothesis, enunciated by others authors in works with less loci (Harris *et al.* 2005; Bruschi *et al.* 2006), may be correct. Therefore, as a final point, we expound the necessity of a deep evaluation of *P. tiliguerta* taxonomy to determine if the divergence of the major lineages (Corsica and Sardinia) is sufficient as to be classified as different species.

Appendix 1. *Podarcis spp* analysed as outgroups.

Species	Sampled Localities
<i>P. lilfordi</i>	Balearic Islands (see Brown <i>et al.</i> 2008)
<i>P. pityusensis</i>	Balearic Islands (see Rodríguez <i>et al.</i> 2013)
<i>P. filfolensis</i>	Maltese Archipelago (see Rodríguez <i>et al.</i> 2014)
<i>P. vaucheri</i>	Oukaïmeden (Morocco) Chafarinas Islands (Spain)
<i>P. carbonelli</i>	Lagoa Comprida, Sierra Estrela (Portugal) Laguna de San Marcos (Salamanca, Spain)
<i>P. muralis</i>	Peñagolosa (Castellón, Spain) La Pinilla (Segovia, Spain)
<i>P. hispanica</i> complex	Don Benito (Badajoz, Spain) Cabrerizos (Salamanca, Spain) Sajazarra (La Rioja, Spain) Peñagolosa (Castellón, Spain) Burjassot (Valencia, Spain)

Appendix 2. Primers sequences used in amplification and sequencing.

Primer	Sequence	Reference
12s rRNA		
L1091	5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'	
H1478	5'- TGA CTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'	Kocher <i>et al.</i> (1989)
Control region		
L150226	5'-TACCCTTGCTCATAGCATAACTG-3'	
H00292	5'-GTCTTGTTGACTGTAATTAACCGATA-3'	Modified from Brehm <i>et al.</i> (2003)
ND1-ND2		
L4178	5'-CARCTWATACACYTACTATGAAA-3'	
H4980	5'-ATTTTTTCGTAGTTGGGTTTGRTT-3'	Macey <i>et al.</i> (1998)
Cytochrome b (ii)		
L14724	5'-TGACTTGAARAACAYCGTTG-3'	
H15175	5'- CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	Palumbi (1996)
L14143	5'-CGTTGTATTCAACTATTA AAA Y-3'	This paper
Cytochrome b (iii)		
L15347	5'-CATGAAACTGGATCAAACAACCC-3'	
H15915	5'- GTCTTCAGTTTTTGGTTTACAAGAC-3'	Fu (2000)
16S rRNA		
16SL1 F	5'-CCGTGCAAAGGTAGCATAATCAC-3'	
16SH1 R	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT -3'	Carranza <i>et al.</i> (1999)
RAG1		
RAG-R1	5'-AAAATCTGCCTTCTGTTATTG-3'	
RAG-fo	5'-GAAAAGGGCTACATCCTGG-3'	Mayer and Pavlicev (2007)
RAG-re	5'-CCAGTTATTGCTTTTACAGTTC-3'	
MC1R		
MC1R-PF	5'GGCNGCCATYGTCAANAACCGGAACC-3'	
MC1R-PR	5'CTCCGRAAGGCRTAAATNATGGGGTCCAC-3'	Modified from Pinho <i>et al.</i> (2010)
APOBE28		
F1	5'-TGCGGGAGGAATAYTTTGA-3'	
R1	5'-TCTATTCTRAGCTCTCCTTSRCGAA-3'	Portik <i>et al.</i> (2012)
BLC9L		
F1	5'-TGGATCCAKCCATGTTTGCTGGG-3'	
R1	5'-GGCGTCTGCGGGGACTTGAG-3'	Portik <i>et al.</i> (2012)
KIAA2018		
F1	5'-CCCATCCYTACCTATGCAGCCATTA-3'	
R1	5'-TGCCCAGCCATTTGTGATATGCTYTGA-3'	Portik <i>et al.</i> (2012)
KIF24		
F1	5'-AAACGTRTCTCCMAAACGCATCC-3'	
R1	5'-GGCTGCTGRAAYTGCTGGTG-3'	Portik <i>et al.</i> (2012)

Appendix 3. The sequenced fragment of *KIA2018* gene (664 bp) included a polymorphic STR with CCT motif. The number of repeats ranged 4 to 9 (12 bp to 27 bp).

Species	Sample	Genotype	Sample	Genotype
<i>P. tiliguerta</i>	Sardinia Island		Corsica Island	
	TSA-1	6-9	TCO-1	6-6
	TSA-2	6-6	TCO-2	7-8
	TSA-3	7-9	TCO-3	6-8
	TSA-4	7-9	TCO-4	6-9
	TSA-5	7-7	TCO-5	4-7
	TSA-12	6-9	TCO-6	6-7
	TSA-13	6-9	TCO-7	5-7
	TSA-15	6-6	TCO-8	5-8
	TSA-17	7-7	TCO-9	8-8
	TSA-18	7-9	TCO-10	7-9
	TSA-19	6-9	TCO-11	7-8
	TSA-20	6-6	TCO-12	5-6
			TCO-13	6-7
		Sardinian islands and islets	TCO-14	5-7
			TCO-17	5-7
	TSA-8	9-9	TCO-18	7-7
	Tp-1	7-7	TCO-19	7-7
	Tp-2	7-7	TCO-20	6-8
	Tp-3	7-7	TCO-21	4-8
	Ts-1	8-8		
Tf-1	8-8			
Tf-2	9-9			
Tf-3	8-8			
<i>P. sicula</i>	Sardinia Island			
	SIG-1	7-10	SIL-2	7-7
	SIN-3	7-7	SIO-5	7-7

Acknowledgements

Our acknowledgement to CERFA for the license for field work in May 2011 (permit No. 13616*01) and the Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, that authorized sampling of lizards in Sardinia (authorization DPN-2010-0017564). We thank M. Bassitta and C. Colom for 16S rRNA amplification and sequencing. This work was financed by the research grants CGL2009-12926-C01, CGL2009-12926-CO2, CGL2012-39850-C01 and CGL2012-39850-CO2 of the Ministerio Español de Economía y Competitividad and European Regional Development Fund (ERDF). V.R. and J.M.B. were funded by FPI fellowships from the Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats (Govern de les Illes Balears), co-financed by the European Social Fund.

DISCUSIÓN GENERAL

Las lagartijas se han convertido en organismos modelo para estudios evolutivos, debido a la gran acumulación de conocimiento sobre demografía, estrategias y ecomorfología y ecofisiología adaptativa (Camargo *et al.* 2010). Los análisis y resultados de esta tesis son una pequeña aportación a este campo, donde el género *Podarcis*, es el hilo conductor en la investigación de patrones de colonización, especiación y diversificación en tres grupos de islas del Mediterráneo Occidental.

Los tres archipiélagos estudiados se pueden designar bajo el término introducido por Alcover *et al.* (1998), islas-como-oceánicas, porque aunque han estado conectadas con el continente en el pasado, faunisticamente son similares a islas oceánicas, presentando una alta tasa de endemismos (Bover *et al.* 2008). Las cuatro *Podarcis sp* que habitan en ellas han sufrido historias evolutivas diferentes, pero, en principio, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que todas se originan por especiación alopátrica, tras la colonización del territorio por parte de antecesores originarios del continente, y posterior aislamiento por cambios eustáticos o por transformaciones debidas a la orogénesis de las islas.

El objetivo de este estudio es extraer la máxima información histórica de la muestra genética, incluyendo exploración de las relaciones entre poblaciones, estructura genética y ritmo de los eventos poblacionales más importantes, así como patrones de flujo génico en algunos casos.

Diversidad Genética

El grado de diferenciación va acompasado con el tiempo de divergencia, las especies que divergen antes, tienen más tiempo para acumular cambios en su material genético. Esto es un claro ejemplo dentro de *Podarcis*. *P. pityusensis* presenta una baja diversidad genética, observada ya en previos estudios (Guillaume & Cirer 1985; Terrasa *et al.* 2004), siendo la especie con menor diversidad dentro del CIMO, lo que coincide también con ser la especie con el origen de divergencia estimado más reciente. Por otra parte, éste, y otros estudios (Capula 1996; Harris *et al.* 2005; Podnar & Mayer 2005; Vasconcelos *et al.* 2006), han evidenciado que *P. tiliguerta* presenta altos niveles de

variabilidad genética. En contraste, otros autores (Capula 1994; Salvi *et al.* 2014) reportan una alta diversidad genética en *P. filfolensis*, en contraposición a la baja variabilidad mostrada en el presente trabajo. Según los resultados de esta tesis, a medida que el origen de diversificación es más lejano en el tiempo, el grado de diversidad genética aumenta, siguiendo la secuencia *P. pityusensis*, *P. filfolensis*, *P. lilfordi* y *P. tiliguerta*. La divergencia intraespecífica se origina en *P. tiliguerta* en el Mioceno, cerca del MRCA que comparten las cuatro especies, en *P. lilfordi* en Plioceno-Pleistoceno (Brown *et al.* 2008), y en *P. filfolensis* y *P. pityusensis*, en el Pleistoceno.

A nivel de ADN nuclear, se ha determinado que los STRs desarrollados para *P. lilfordi* funcionan para su especie hermana, *P. pityusensis*, y, once de ellos, también para *P. filfolensis*. En principio, un conjunto de microsatélites puede genotiparse en especies cercanas (Runemark *et al.* 2008; Wellenreuther *et al.* 2008; Huyghe *et al.* 2009), porque las regiones flanqueantes están conservadas dentro del mismo taxón, pero la probabilidad de detectar el *locus* disminuye al aumentar la distancia evolutiva (Primmer *et al.* 1996), pudiendo ser este el motivo de que fallasen tres *loci* en la caracterización de *P. filfolensis* (la especie más alejada evolutivamente). Los *primers* se diseñan en las zonas flanqueantes, que son zonas no codificantes con un ratio de sustitución nucleotídica elevado, por lo que es más difícil que éstas estén conservadas en diferentes grupos taxonómicos (Wan *et al.* 2004).

Algunos autores describen que al amplificar STRs en una especie diferente a la que se usó para aislarlo, se registra un menor número de alelos y éstos son de menor tamaño, y que ambos factores disminuyen al aumentar la distancia genética (Primmer *et al.* 1996; Ellegren *et al.* 1997; Wellenreuther *et al.* 2008; Huyghe *et al.* 2009). Este patrón también se observa en las especies estudiadas de *Podarcis*. El número de alelos por *locus* en *P. pityusensis* es de 9 (Pli22, Pli24) a 25 (Pli4), con una media de 15.7 alelos por *locus*; en *P. filfolensis* va de 2 (Pli10) a 20 (Pli17), con una media de 10.8 alelos; mientras que en *P. lilfordi*, especie a partir de la cual se diseñaron los *loci* STR, el rango va de 6 (Pli22) a 19 (Pli4), con una media de 12.1 alelos, cuando sólo se analiza una localidad, Dragonera, y de 9 (Pli22) a 29 (Pli12), con una media de 18.7 alelos, a nivel de especie.

Varios autores sugieren que esto es debido a un sesgo en el proceso de desarrollo de los *loci*: por un lado asociado al método de clonaje (la sonda no hibrida con secuencias de pocas repeticiones), y por otro asociado a la selección de los *loci*, ya que se elige el microsatélite de mayor longitud para asegurar que sea polimórfico (Ellegren *et al.* 1997; Neff & Gross 2001). Ellegren *et al.* (1997) concluyen, por tanto, que la comparación del patrón evolutivo de microsatélites entre especies presenta inconsistencias.

Sin embargo, se han observado algunas pautas llamativas (ver Anexo 4): i) todas las especies presentan alelos exclusivos que no se encuentran en el resto de taxones; ii) para varios STRs es *P. pityusensis* la especie que abarca el mayor rango alélico, aunque no presenta todos los alelos descritos, a diferencia de *P. lilfordi*, cuyo rango es más compacto; iii) *P. lilfordi* y *P. pityusensis* presentan patrones alélicos semejantes, mientras que los individuos de *P. filfolensis* se concentran en alelos de mayor tamaño en la mayoría de *loci*, y en los alelos menores, en otros; iv) los alelos más frecuentes no suelen coincidir entre especies, a excepción de en el STR 3 (255, 259), 5 (384, 388), 8 (147, 151), 10 y 18 (en este último, *P. filfolensis* no presenta los mismos alelos modales, éstos están desplazados un *repeat*).

A nivel de ADN mitocondrial, lo más destacable, al igual que con el marcador nuclear, es la gran variabilidad observada en *P. tiliguerta* respecto a las otras especies del CIMO. Utilizando como muestra de variabilidad el número medio de diferencias entre dos secuencias, se observa que *P. tiliguerta* (216.09 nt) tiene un valor casi cinco veces mayor que *P. lilfordi* (45.1 nt), y casi veintitrés y veinticuatro veces el valor de *P. filfolensis* (9.4 nt) y *P. pityusensis* (9.1 nt), respectivamente. Además, es la única especie para la que se ha tenido que modificar la secuencia de un *primer* (*primer* L del citocromo b en muestras de Cerdeña), que suelen situarse en regiones que se mantienen conservadas entre grupos cercanos.

Es interesante destacar respecto a este marcador mitocondrial, más anecdótico que objeto de esta tesis, la manera en que su determinación refleja las mejorías acontecidas a lo largo del tiempo en los métodos de análisis moleculares, a nivel de reactivos, materiales, instrumental o equipamiento (modernización de cuantificadores, termocicladores, analizadores de imagen o secuenciadores automáticos). Esta evolución

se manifiesta por ejemplo en la longitud de las secuencias obtenidas, como reflejo de la calidad de éstas, pues permite determinar una fracción mayor. Utilizando exactamente los mismos *primers*, las secuencias para *P. lilfordi* tienen una longitud de 2.382 pb (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009); para *P. pityusensis*, 2.430 pb; para *P. filfolensis*, 2.533 pb y para *P. tiliguerta*, 2.681 pb, computando una diferencia de casi 300 pb entre el primer y el último estudio. En este campo los avances son continuos y progresivos, de forma que una pequeña innovación puede derivar en una gran mejora a nivel analítico y resolutivo.

Linajes evolutivos

Para interpretar la estructura genética actual hay que tener en cuenta que ésta es resultado de una interacción de la biología, geografía y cambios climáticos (Hewitt 2000). Las tres especies investigadas revelan gran estructuración genética, presentando, los diferentes linajes identificados dentro de cada taxón, una distribución con alta correlación geográfica. *P. pityusensis* y *P. filfolensis* presentan dos linajes principales. En la especie pitiusa se identifican estos dos grupos, tanto a nivel nuclear como mitocondrial, con ciertas discordancias entre ellos por la presencia de individuos “mezcla”, que son asignados a un grupo distinto al que le correspondería su situación geográfica. Básicamente, un grupo incluye especímenes de Formentera e islas de Freus, y el otro a individuos de las islas satélite de Ibiza, mientras que ejemplares de Ibiza agrupan con uno u otro en función del marcador analizado: con sus islas circundantes según datos nucleares y con Formentera y sus islas, según datos mitocondriales. Sin embargo, a pesar de formar un grupo compacto según el ADNmt, algunos especímenes de Formentera muestran afinidad con muestras de Ibiza en el análisis nuclear, mientras que ejemplares de Ibiza, que forman un *cluster* claro según microsatélites, se reparten en ambos grupos delimitados con ADNmt. Este patrón podría explicarse por la introducción de muestras de Formentera –apoyado por las estimas de migración obtenidas en sentido de Formentera a Ibiza (7.19, 95% HPD: 0–22.33 migrantes por generación)– y la captura del ADNmt de Formentera, que podría presentar una ventaja selectiva, por parte de los especímenes nativos de Ibiza. De esta manera, los individuos ibicencos que se diferencian del grupo de Formentera a nivel nuclear y mitocondrial no se vieron afectados por la colonización e introgresión mitocondrial, y representan la composición genética original del linaje de Ibiza.

En el caso de *P. filfolensis*, uno de los linajes se distribuye en la isla de Malta, mientras que el otro se encuentra en el resto de islas del archipiélago y en las Islas Pelágicas. Los bajos coeficientes de pertenencia obtenidos en el análisis de microsátélites, así como la presencia de individuos “mezcla”, indicarían introducciones recientes, posiblemente por la expansión durante la última conexión de las islas, ya que no se evidencia con el marcador mitocondrial. La inclusión de especímenes de las Islas Pelágicas en el linaje de Gozo, Comino e islotes satélites, sugiere una translocación a partir de una de estas islas en tiempos recientes, como propone previamente Capula (1994) en un trabajo anterior, probablemente debido a dispersión antropogénica, ya que ambos archipiélagos están separados por un canal de más de 1.000 m de profundidad, impidiendo la conexión terrestre desde la MSC. En análisis posteriores, Salvi *et al.* (2014) observan un patrón semejante al sugerido por este trabajo, tanto en la estructura geográfica mitocondrial, con un grupo distribuido en Malta (y Filfa) y otro en Gozo, Comino, islas satélites e Islas Pelágicas, como en la menor definición, en su caso ausencia, de una estructuración geográfica de la diversidad nuclear.

Por último, el ADN mitocondrial de *P. tiliguerta* revela cinco linajes diferentes con una importante correspondencia geográfica, separando Córcega en norte, suroeste y sureste, y Cerdeña en norte –incluyendo también las islas analizadas– y sur. Esta estructuración genética, junto con la gran variabilidad identificada en la especie, son factores clave en descripciones previas de complejos de especies (ej. Harris *et al.* 2002, Poulakakis *et al.* 2003). De esta forma, se refuerza la hipótesis, enunciada por varios autores, que indica que la extremada diversidad genética (Harris *et al.* 2005; Vasconcelos *et al.* 2006) y las diferencias morfológicas observadas (Bruschi *et al.* 2006) entre especímenes de ambas islas, sugieren que *P. tiliguerta* es un complejo de especies. No siendo este un concepto nuevo, ya que la identificación de que especies únicas en realidad eran complejos de especies, se ha producido anteriormente en el género, por ejemplo en *P. hispánica* (Harris *et al.* 2002; Pinho *et al.* 2006; Pinho *et al.* 2007; Carretero 2008; Kaliontzopoulou *et al.* 2012) o *P. erhardii* (Poulakakis *et al.* 2003).

Por otro lado, Hasbún *et al.* (2005) indican que una divergencia de entre 2–5.4% permite el reconocimiento de especies diferentes, especificando así límites para definir taxones dentro de escamosos (Pinho *et al.* 2007). Siendo la divergencia observada en esta

tesis entre secuencias de Córcega y Cerdeña del 9.4%, hay que resaltar que no sólo es un porcentaje mayor al reportado por los autores, sino que además contrasta con la divergencia determinada entre linajes en el resto de especies, de un rango menor (0.6% entre linajes de *P. pityusensis* y 0.83% entre los de *P. filfolensis*). Sin embargo, la alta divergencia identificada también entre los propios linajes de *P. tiliguerta* – 9.6% entre los clados norte y sur de Cerdeña, y un rango de 4.3–8% entre linajes de Córcega– cuestiona que el valor de divergencia planteado por los autores para limitar especies sea apropiado en este caso.

Un método alternativo propuesto para determinar la idoneidad de elevar al rango de especie es comparar la distancia genética con un taxón hermano, se consensua un valor umbral y si las subespecies superan ese valor se eleva de categoría, en caso contrario, se mantiene en la misma (Torstrom *et al.* 2014). Los valores de divergencia observados respecto a las especies del CIMO (10.31% con *P. lilfordi*, 10.11% con *P. pityusensis* o 9.67% respecto a *P. filfolensis*) y especies más lejanas, aunque con pocas secuencias para comparar, al extrapolar el análisis (9.44% con *P. sicula*, 9.93% con *P. muralis*, 10.24% con *P. carbonelli*, 10.28% con *P. hispanica* y 11.08% con *P. vaucheri*), muestran que la divergencia entre las secuencias de Córcega y Cerdeña no es tan diferente de la presente entre *P. tiliguerta* y el resto de especies. En consecuencia, ante todos los indicios descritos, se hace necesario una evaluación profunda de la taxonomía de la especie, para determinar si el conjunto de linajes de cada isla puede clasificarse como taxones diferentes. Bajo esta hipótesis, tanto Cerdeña como Córcega constituirían por si mismos entidades diferentes en el rango de especie.

Reed & Frankham (2001) indican que sólo un 4% de la varianza en caracteres cuantitativos puede explicarse por los resultados obtenidos con marcadores moleculares. Conociendo los linajes identificados en las especies del CIMO es fácil indicar que no hay soporte genético para las subespecies designadas en base a características morfológicas, algo no inusual en vertebrados (Zink 2004). En otras especies de *Podarcis* también se ha señalado esta falta de concordancia entre la estructura filogeográfica observada y la división en subespecies, evidenciando que la taxonomía intraespecífica refleja variedades fenotípicas locales y no distintas unidades evolutivas (Salvi *et al.* 2013). Sin embargo, su

reconocimiento muestra la gran variabilidad de formas únicas, pudiendo ayudar a promover su conservación. En los tres taxones estudiados se advierte un patrón general, la especie está fragmentada en multitud de poblaciones, muchas de ellas aisladas en islas más pequeñas o islotes, donde han divergido de forma diferente a las poblaciones establecidas en las islas principales. No hay que olvidar la relevancia de los hábitats en inducir cambios morfológicos en lacértidos (Fulgione *et al.* 2008). Ante esto, la variabilidad genética analizada no reconoce toda la variabilidad morfológica presente en las especies.

En *P. pityusensis* se han identificado dos linajes principales, a pesar de analizar individuos correspondientes a 22 subespecies (*P. p. canaretensis*, no incluida), por tanto cada linaje genético incluye varias subespecies taxonómicas que evidencian características morfológicas únicas. Respecto a *P. filfolensis*, tres de sus subespecies están restringidas a pequeñas islas satélite y no han sido incluidas en los estudios. *P. f. maltensis* se encuentra distribuida en las islas principales (Malta, Gozo y Comino), en las que se han identificado dos linajes genéticos correlacionados geográficamente, uno en Malta y otro en el resto de islas, también incluyendo este último las Islas Pelágicas, donde los especímenes pertenecen a una subespecie diferente, *P. f. laurentiimuelleri*. Por consiguiente, a falta de evaluar las subespecies *P. f. kieselbachi* (se cree extinta), *P. f. filfolensis* y *P. f. generalensis* ya se observa una discrepancia entre la diversidad morfológica y la genética, en este caso la variabilidad genética no se ve reflejada morfológicamente dentro de *P. f. maltensis*.

Por último, en *P. tiliguerta* el patrón es extremo. De las once subespecies descritas (véase Anexo 2), sólo una está presente en las islas principales de Córcega y Cerdeña, *P. t. tiliguerta*, las restantes son particulares de islas o islotes satélites (Bruschi *et al.* 2011), especialmente de Córcega. Por lo tanto, los cinco linajes mitocondriales identificados en la lagartija tirrena, se corresponden con una misma subespecie, ya que para este trabajo se ha muestreado esencialmente las islas principales, y algunas islas o islotes satélites de Cerdeña –Foradada, Molar y dos islas del archipiélago de La Magdalena–, por lo que sólo se han incluido especímenes de *P. t. tiliguerta*.

En resumen, el aislamiento en islas e islotes circundantes en los archipiélagos del Mediterráneo, en general, permite una nueva diferenciación de las poblaciones, que evolucionan independientemente de las presentes en islas principales, poniéndose de manifiesto la gran diversidad alcanzada por la descripción de numerosas subespecies, que pretenden describir el amplio abanico de características morfológicas.

Torstrom *et al.* (2014) realizaron una revisión bibliográfica para determinar si cuando se revisa o evalúa genéticamente el número de subespecies, este valor cambia tras la evaluación. Los autores indican que, en reptiles, a menudo los datos genéticos no apoyan las subespecies reconocidas, basadas en diferencias morfológicas, y reportan una tendencia clara en Lacertilia, donde disminuye significativamente el número de subespecies y aumenta, también significativamente, el número de especies, indicando que hay grupos que se elevan de categoría tras su valoración. Esto es consecuencia directa de la elevada diversidad morfológica presente en el grupo. En concordancia con esta coyuntura, y como se ha manifestado anteriormente, resultados de esta tesis señalan la necesidad de revisar la taxonomía de *P. tiliguerta*, que otros autores ya han sugerido como complejo de especies, lo que derivaría en el aumento del número de taxones en el género.

Conservación

En la actualidad, los factores que afectan en mayor medida la conservación de las especies, tienen un origen antropogénico. Una de las consecuencias ambientales más importantes del despliegue de la especie humana en el planeta, es la extinción de un alto número de especies (Wilson 1992). Esto ha conducido a que algunos autores enuncien que estamos en la era del Antropoceno, donde el hombre es el mayor impulsor de procesos a escala global (Crutzen 2002; Zalasiewicz *et al.* 2010) o que, en el presente, el hombre está siendo el causante de la sexta extinción en masa (Lee 2001).

En general, los reptiles son particularmente sensibles a la degradación del hábitat debido a su baja habilidad de dispersión (comparativamente), la especialización morfológica en un tipo de sustrato o las limitaciones termorreguladoras que presentan (Kearney *et al.* 2009). Si, además de esto, se tiene en cuenta que las poblaciones insulares de vertebrados son más propensas a extinción que las del continente –ya que normalmente presentan menor diversidad genética y son más endogámicas– y, a su vez, que las

poblaciones endémicas tienen también mayor tendencia a la extinción que las no endémicas (Frankham 1997; Frankham 1998; Frankham *et al.* 2002), las especies de reptiles endémicas e insulares, como es el caso de las analizadas en este trabajo, se convierten en un grupo de riesgo importante.

En el caso de *Podarcis*, las amenazas principales a las que se enfrenta el género son la fragmentación de las poblaciones y las perturbaciones derivadas de actividades humanas, como la pérdida, fragmentación y destrucción de hábitats, la presión ejercida por el turismo o la introducción de especies competidoras o depredadoras. Como tantos otros grupos de reptiles, éstos pueden ser firmes candidatos para convertirse en críticamente amenazados en el futuro, si no se toman medidas para eliminar los procesos antropogénicos que afectan a sus poblaciones (Böhm *et al.* 2013).

Que las poblaciones estén fragmentadas –lo que implica que están aisladas y son de tamaño reducido–, las hace más susceptibles a efectos estocásticos ambientales (catástrofes naturales, enfermedades) y demográficos (variaciones en el ratio de sexos, mortalidad, reproducción), a la vez que están más sujetas a erosión genética, es decir, pérdida de diversidad genética y depresión endogámica, factores, todos ellos, que aumentan el riesgo de extinción (Frankham *et al.* 2002; Frankham 2003; Wan *et al.* 2004). El coste genético asociado al aislamiento es severo, se aumenta la consanguinidad, lo que reduce la viabilidad de la población (Frankham 1995) y se pierde varianza neutral cuantitativa, acumulándose mutaciones deletéreas y reduciendo, de nuevo, la viabilidad. En consecuencia, un largo aislamiento impide que una población pueda mantener su viabilidad o enfrentarse a cambios en el ambiente, debido a la pérdida de diversidad genética (Moritz 1999).

El dogma central en la genética de la conservación es la preservación de la variabilidad genética, ya que es un prerrequisito para la evolución, y su pérdida compromete su potencial evolutivo, al reducir la habilidad de las poblaciones a afrontar y superar cambios en el ambiente, aumentando así la susceptibilidad a la extinción. El declive de las poblaciones determina específicamente la pérdida de ésta (O'Brien 1994), por tanto, es importante valorar el estatus de las poblaciones para implementar estrategias

que permitan detener o retrasar la extinción, y esta valoración es posible por medio de marcadores genéticos (Wan *et al.* 2004).

El conocimiento detallado de las diferentes estructuras filogeográficas es esencial para la conservación de la diversidad genética y la gestión de ESUs en las especies (Schmitt 2007). En este trabajo se aplica el concepto de ESU *sensu* Moritz (1994), que presenta una aproximación más filogeográfica. A partir de este criterio, dos ESUs podrían definirse tanto para *P. pityusensis*: una para el linaje original de Ibiza (sin tener en cuenta las muestras que parecen ser introducidas) y otra para el linaje de Formentera; como para *P. filfolensis*: una para la isla de Malta y otra para el resto del territorio. Previamente se ha descrito una unidad de conservación para *P. filfolensis*, concretamente una MU *sensu* Moritz (1994) para la población de Selmunett, aunque los autores establecen que podría considerarse como una ESU (Sciberras & Schembri 2008).

Como se ha ido reiterando a lo largo de este trabajo, la característica más definitoria del género *Podarcis* es la gran variabilidad morfológica descrita en sus poblaciones, con patrones diversos y exclusivos en función de las islas e islotes en las que habita. Ante esto, es importante resaltar que cada una de ellas podría significar la propuesta de una ESU, bajo el criterio *sensu* Waples (1991), ya que este autor asigna estas unidades de conservación a poblaciones reproductivamente separadas, con adaptaciones diferentes, o únicas, al representar un componente importante del legado evolutivo de las especies.

Los cambios en la biodiversidad a nivel de especies están monitorizados por la IUCN, en la Lista Roja de Especies Amenazadas. De las tres especies estudiadas, dos están catalogadas por esta organización como de preocupación menor, *P. tiliguerta* y *P. filfolensis* (Corti *et al.* 2009a; Cheylan *et al.* 2009), mientras que el estatus de conservación de *P. pityusensis* es de casi amenazada (Pérez-Mellado & Martínez-Solano 2009b). Aunque las poblaciones de las islas principales de la lagartija pitiusa no se consideran amenazadas, catorce de las subespecies (véase Anexo 1) distribuidas por islas satélites están clasificadas como vulnerables, y cuatro, como en peligro crítico (Viada Saulea 2005). Por tanto, es importante su monitorización, y la conservación de sus hábitats. La asignación de *P. filfolensis* como de preocupación menor se justifica porque es común, adaptable, no parece estar en declive y ocurre en menos de 5.000 Km² (Corti *et al.* 2009a). No obstante,

la distribución parcheada de la especie y la baja densidad poblacional observada en la isla de Malta, con poblaciones de pequeño tamaño, junto con la reducida diversidad genética inferida, y el estado de degradación actual que presenta la isla, manifiestan la necesidad de una revisión de su estatus de conservación, siendo preciso el reconocimiento de una categoría de amenazada mayor para *P. filfolensis*, y la promoción de iniciativas para conservar sus poblaciones y su hábitat.

Cinco ESUs podrían describirse para *P. tiliguerta* en consonancia con los cinco linajes evolutivos identificados; sin embargo, el estado de sus poblaciones no hace imperativo, como en el caso de las otras especies del CIMO, establecer medidas de conservación específicas más allá de la conservación de sus hábitats y la limitación de perturbaciones antropogénicas.

Según McNeely *et al.* (1990), la naturaleza debe conservarse a tres niveles: la diversidad genética, la diversidad de especies y la diversidad de ecosistemas. Las ESUs identificadas para *P. pityusensis*, *P. filfolensis* y *P. tiliguerta*, permiten conservar los dos primeros niveles. A partir de esto, es importante maximizar el área y la calidad de éste (Moritz 2002), y proteger la conectividad entre hábitats con gradientes ambientales, para preservar así ecotonos, como áreas de diversificación activa.

Relaciones interespecíficas

Las relaciones filogenéticas entre especies de *Podarcis* son controvertidas, y han variado en función del estudio y el marcador analizado. Se ha señalado a *P. filfolensis* como taxón hermano de *P. wagneriana*, especie endémica de Sicilia e Islas Egadi (Lanza & Cei 1977; Oliverio *et al.* 1998; Oliverio *et al.* 2000; Podnar & Mayer 2005), originadas a partir de un MRCA tras la separación de Sicilia y el Archipiélago Maltés (Scalera *et al.* 2004); o de *P. sicula*, especie predominante del sureste europeo, y posiblemente *P. melisellensis*, especie de la costa este Adriática (Capula *et al.* 1988; Capula 1994). Mientras que *P. tiliguerta* forma un clado único apartado del resto de especies italianas según Oliverio *et al.* (1998), se une a *P. raffonei* según Oliverio *et al.* (2000) o presenta un antecesor común con el tandem *P. wagneriana*-*P. raffonei*, según Podnar & Mayer (2005), o con *P. filfolensis*, *P. sicula* y *P. muralis*. (Pyron *et al.* 2013) Sin embargo, la

relación entre *P. lilfordi* y *P. pityusensis* no es cuestionada, todos los autores confirman que son especies hermanas.

Análisis establecidos por Harris *et al.* (2005) muestran que *P. lilfordi*, *P. pityusensis* y *P. tiliguerta* se agrupan en un mismo clado. Posteriormente, Arnold *et al.* (2007) incorporan también a la especie maltesa, agrupando a las cuatro especies –*P. lilfordi*, *P. pityusensis*, *P. filfolensis* y *P. tiliguerta*– en un mismo *cluster*, el Clado de Islas del Mediterráneo Occidental. No obstante, en sus análisis no están incluidos especímenes de *P. wagleriana* o *P. raffonei*, por lo que su relación no está resuelta en la actualidad. Los resultados obtenidos en trabajos de esta tesis reafirman la hipótesis filogenética presentada por Arnold *et al.* (2007), sobre la inclusión en el Clado de Islas del Mediterráneo Occidental de las especies *P. lilfordi*, *P. pityusensis*, *P. filfolensis* y *P. tiliguerta*. En la inferencia del árbol de linajes se incluyen, como *outgroups*, muestras de *P. carbonelli*, *P. vaucheri*, *P. hispanica* y *P. muralis*, y todas ellas se reúnen en un clado independiente del CIMO, mostrando monofilia recíproca.

Ecológicamente hay que destacar la relación de *P. tiliguerta* con su congénere, *P. sicula*, especie destacada por su gran habilidad colonizadora. Tanto en Córcega –*P. s. campestris*– (Vanhooydonck *et al.* 2000), como en Cerdeña –*P. s. cetti*– (Pérez-Mellado, V., comunicación personal), *P. tiliguerta* y *P. sicula* viven en simpatría. La lagartija tirrena concentra su actividad en superficies verticales, como paredes de piedra, mientras que la italiana prefiere un hábitat con vegetación densa. Hay que tener en cuenta que la población de *P. sicula* de Cerdeña es distintiva respecto a las poblaciones de Sicilia, o el continente, y que es considerada una subespecie endémica, *P. s. cetti* (Salvi & Bombi 2010). Además, se ha revelado un ejemplo de hibridación de ésta con *P. tiliguerta*, resultando híbridos con características morfológicas intermedias de los parentales (Capula 2002). Aunque sólo se han incluido cuatro especímenes de *P. sicula* en este trabajo, los resultados son claros. La divergencia observada respecto a *P. tiliguerta* es alta (de 9.5% respecto a Cerdeña y 9.29% respecto a Córcega) y en análisis de agrupamiento, *P. sicula* forma un grupo aparte, con gran coeficiente de asignación. Por tanto, no se aprecia evidencia de hibridación entre ambas especies.

Escenario Biogeográfico

Las especies con distribución restringida y taxones representando linajes únicos, pueden ser interesantes modelos de organismos para investigar los procesos de diferenciación, especiación y co-evolución, y, a menudo, ofrecen la clave para responder a cuestiones biogeográficas a gran escala (Grill *et al.* 2007), este es el caso de las especies de *Podarcis*.

Uno de los mecanismos más señalados en la formación de especies (y corriente en la de lacértidos; Capula, 1988, Arnold, 1973, 1989) es la especiación alopátrica (Platnick & Nelson 1978). La aparición de barreras extrínsecas interrumpe el flujo génico y aísla las poblaciones, que seguidamente evolucionan por aislamiento reproductivo intrínseco, siendo la vicarianza la situación en que la barrera surge y subdivide el rango de la especie en dos rangos discontinuos (Lamm & Redelings 2009). La dispersión entre islas distantes y la vicarianza, debido a eventos geofísicos, explican a menudo la diversidad encontrada en islas (Brown & Pestano 1998; Malhotra & Thorpe 2000; Cox *et al.* 2010), y parecen ser también los procesos promotores de variabilidad en las lagartijas de los archipiélagos balear, maltés y corso-sardo. En todos los casos, la orogenia y geología del Mediterráneo, así como los cambios eustáticos acontecidos históricamente, han jugado un papel importante en el origen y diversificación de las especies que lo habitan.

El origen de *Podarcis* podría situarse, según varios autores, en el Eoceno (*c.* 33 Ma AP, Oliverio *et al.* 1998) o Mioceno (16–12 Ma AP, Arnold *et al.* 2007). La estima obtenida en el presente trabajo, representa el tiempo de divergencia desde el antecesor común más reciente a las ocho especies analizadas, no el origen del género, aunque es un valor orientativo. El tiempo de divergencia obtenido es de *c.* 17 Ma (23.41–12.57 Ma), semejante a dataciones anteriores del origen de diversidad del género (*c.* 16 Ma AP, Oliverio *et al.* 1998; *c.* 12 Ma AP, Gassert *et al.* 2013; *c.* 9 Ma AP Arnold *et al.* 2007).

El origen de *P. tiliguerta*, la primera especie en divergir, se data hace 20.93–10.73 Ma, muy próximo al origen de diversificación del género, y conteniendo dentro de su rango de datación estimas previas (13 Ma; Oliverio *et al.* 1998). La divergencia intraespecífica de la especie tirrena se inicia hace *c.* 13 Ma (18.83–8.58 Ma), a pesar del

rango amplio de esta estimación, engloba completamente las estimaciones geológicas del periodo de división del bloque de Córcega-Cerdeña en las respectivas islas (15–9 Ma AP; Álvarez, 1972; 1974). Esta concordancia entre rotura de la microplaca y separación de linajes se ha propuesto previamente en la literatura (Caccone *et al.* 1994; Omodeo & Rota 2008) para otros taxones. A partir de esto se puede deducir que el precursor de la especie coloniza la microplaca antes de la escisión de las islas. Sin embargo, que el nodo basal del género (23.41–12.57 Ma AP) sea posterior a la separación del bloque corso-sardo de la península (30–28 Ma AP), implica que estos antecesores alcanzan la microplaca durante su desplazamiento, a través del puente con el continente, como se ha sugerido para otros endemismos (Carranza & Amat 2005; Ketmaier *et al.* 2006; Carranza *et al.* 2008).

Posteriormente, dos nuevos eventos cladogenéticos originan los linajes de Cerdeña (16.41–3.46 Ma), y los de Córcega (13.01–3.5 Ma). Aunque la amplitud del rango de datación dificulta su correlación con sucesos geológicos, en el caso de Cerdeña podría deberse al aislamiento de ciertas regiones de la isla, ya que está faunísticamente fragmentada, y constituye un archipiélago por sí misma. Por un lado, la región de Gallura, al noreste de la isla (Omodeo & Rota 2008), permanece largo tiempo aislada ecológicamente del resto de la isla, aunque conecta con Córcega cuando baja el nivel del mar durante periodos glaciares, lo que ha hecho que actualmente presente un ratio de endemismos superior al 84%. Por otro lado, la región suroeste (sectores Sulcis e Iglesias) permanece también separada del resto de la isla por una entrada de agua de mar en forma de canal, y es considerada una región biogeográfica independiente por las características bioclimáticas, paleogeográficas, geomorfológicas, geolíticas y la vegetación única que presenta (Braccheta *et al.* 2007). De igual importancia, el origen de los tres linajes de Córcega, distribuidos geográficamente en norte, suroeste y sureste, podría estar modulado por la cadena montañosa que va de noroeste a sureste de la isla, actuando de barrera geográfica.

Uno de los eventos geológicos que ha impregnado una mayor huella es la Crisis Salina Mesiniense, la cual ha tenido un gran impacto no sólo en las especies de *Podarcis* del CIMO, sino en muchos taxones de islas del Mediterráneo (Carranza & Amat 2005; Marra 2005; Bover *et al.* 2008; Cano-Maqueda *et al.* 2008; Carranza *et al.* 2008; Gentile

et al. 2010; Bauza-Ribot *et al.* 2011; Bidegaray-Batista & Arnedo 2011; Kaliontzopoulou *et al.* 2011), esculpiendo los patrones de diversidad que reconocemos en la actualidad, en gran medida porque este evento promueve un intercambio significativo de fauna entre África y Europa (Bover *et al.* 2008).

La MSC determina el origen de tres de las especies insulares de *Podarcis* estudiadas. La inundación de la Cuenca Mediterránea, al término de la crisis salina, aísla las Islas Gimnesias de las Islas Pitiusas, y desencadena un proceso de especiación alopátrica: la aparición del mar como barrera geográfica, el aislamiento prolongado y la adaptación a los hábitats propios de cada isla deriva en el origen de *P. lilfordi* y *P. pityusensis* (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009). La MSC también es determinante en la historia evolutiva de *P. filfolensis*. La Plataforma Pelágica emerge hace 7–5 Ma (Micallef *et al.* 2012) y es durante este periodo, como consecuencia de la desecación del Mediterráneo, cuando el archipiélago es colonizado por especies de Europa y África (Cassar *et al.* 2008), entre ellos los antecesores de *P. filfolensis*. Al igual que con las especies baleares, el rellenado de la Cuenca Mediterránea aísla el archipiélago del continente y promueve la diferenciación y origen de *P. filfolensis*.

Bover *et al.* (2008) sostienen que la MSC es el tiempo de colonización de las Islas Baleares, como se ha sugerido para el archipiélago Maltés (Cassar *et al.* 2008), y, por tanto, que al igual que en el caso de *P. filfolensis*, el antecesor de *P. pityusensis*-*P. lilfordi* también accede a las islas en este momento. Aunque esta hipótesis está apoyada por la presencia de restos fósiles de *Podarcis* en depósitos del Pleistoceno Inferior (Mallorca) y el Plioceno (Ibiza y Menorca) (Bover *et al.* 2008), es interesante contrastarla también con el árbol de poblaciones, ya que los eventos biogeográficos están reflejados en ellos, y las genealogías se usan frecuentemente para ilustrar procesos de divergencia de especies y diferenciación de poblaciones (Knowles & Maddison 2002). El árbol puede arrojar cierta luz a esta cuestión, tanto por medio de las estimas de tiempo desde el antecesor común más reciente, como del patrón de ramificación. Hay dos escenarios posibles: i) los predecesores de *P. pityusensis* y *P. lilfordi* se encuentran en el promotorio balear antes de la desconexión de la Península Ibérica o ii) llegan al promotorio posteriormente, siendo lo más probable durante la MSC. Partiendo de que tanto el antecesor común de *P. filfolensis* y *P. lilfordi*-*P. pityusensis* (c. 18–5 Ma), como el origen de diversidad del

género (23.41–12.57 Ma) se sitúan en el Mioceno, mientras que el promotorio balear se escinde de la Península Ibérica, paralelamente a la microplaca corso-sarda, en el Oligoceno (*c.* 10 Ma antes), es fácil, basándose en las dataciones obtenidas, sugerir una colonización del territorio posterior a la escisión del promotorio de la península (escenario ii). No obstante, no es apropiado descartar completamente el primer escenario (i), pues no se presentan estimas del origen del género, que a pesar de que algunos autores ubican en el Mioceno (Arnold *et al.* 2007), otros lo sitúan en el Eoceno (Oliverio *et al.* 1998).

En este contexto, el patrón de ramificación del árbol de poblaciones también apoya una colonización posterior al aislamiento. Teóricamente, el primer escenario implica tres sucesos relevantes que no se aprecian en el árbol de poblaciones. En primer lugar, un evento cladogenético consecutivo o próximo al aislamiento físico de la Península Ibérica, por el distanciamiento de los dos grupos de islas (Gimnesias de Pitiusas), sin embargo éste no se produce hasta el final de la MSC. En segundo lugar, y como consecuencia del primero, las ramas referentes a estas especies serían más largas. Y, por último, si ambos archipiélagos se colonizan, aproximadamente, en el mismo tiempo y a partir de la misma fuente de organismos continental, las especies propias de las Baleares presentarían un MRCA más próximo a *P. tiliguerta*, que a *P. filfolensis*. A no ser que sean los precursores de *P. lilfordi*-*P. pityusensis* los que se desplacen hasta la Plataforma Pelágica durante la MSC, convirtiéndose en precursores de *P. filfolensis*. La hipótesis más sencilla, y que mejor concuerda con el árbol filogenético obtenido, es que el archipiélago balear es colonizado durante la MSC, mientras que la colonización Córcega y Cerdeña se produce antes de perder el contacto definitivo con el continente.

Sin embargo, la pérdida de linajes a través de la historia puede variar los patrones filogeográficos que se observan en la actualidad, y sesgar así su interpretación. Una observación inquietante es que no ha ocurrido un evento cladogenético desde el origen de *P. pityusensis* (5.33 Ma) hasta justo 300–100 Ka AP, hecho que podría deberse a: i) que se ha mantenido un flujo génico elevado entre poblaciones, sin embargo éstas están muy fragmentadas y parece una hipótesis poco probable; ii) otra opción sería que el potencial de divergencia de *P. pityusensis* se ha visto reducido debido al pequeño tamaño de las islas y lo cerca que están unas de otras, y por último, la opción más probable, es iii) que se produjeron estos eventos, pero que, posteriormente, estos linajes ancestrales de

P. pityusensis se han extinguido. Esta última opción encuentra apoyo en que los cambios eustáticos acontecidos en el Plioceno y Pleistoceno derivan en la inundación de las islas, repetidamente, debido a la geomorfología de éstas, potenciando así mecanismos de extinción. No obstante, este aspecto de pérdidas de linajes, ensombrece la hipótesis que describe el escenario de cómo los precursores de *Podarcis* alcanzan las Baleares.

En *P. filfolensis* se observa un escenario similar, más extremo si cabe. A pesar que el origen de la especie se sitúa hace 14–6 Ma, el evento cladogenético que separa ambos linajes no se produce hasta hace 869–105 Ka. La pérdida de linajes ancestrales sería, también en este caso, la hipótesis más plausible, presentando, además, estas islas un relieve más plano que dificulta el refugio ante la subida del nivel del mar desencadenando la pérdida linajes. Sin embargo, el flujo génico entre islas y con el continente en las repetidas conexiones en el Pleistoceno, es un componente homogeneizador a tener en cuenta.

Aunque la MSC rubrique el origen de las especies o linajes, son las oscilaciones climáticas del Plioceno y el Pleistoceno las que determinan su diversidad, jugando un papel importante en la estructura de la biodiversidad actual (Hewitt 2000, 2004b), y, posiblemente, causando efectos mayores en la paleogeografía de Mediterráneo Occidental (Bisconti *et al.* 2011a). Los eventos del Pleistoceno inducen especiación insular *sensu lato* (Grill *et al.* 2007) y, en muchos casos, aceleran procesos de especiación que empezaron en el Plioceno (Blondel *et al.* 2010).

Los efectos de la Edad de Hielo en los rangos de especies varían con la latitud y la topografía (Hewitt 2004a). En el continente europeo, la respuesta frente a estas oscilaciones climáticas es en modo de contracciones hacia refugios glaciares, seguidos por expansiones postglaciares para recolonizar territorios (Hewitt 1996; Hewitt 1999; Gassert *et al.* 2013; Salvi *et al.* 2013). En las islas, en cambio, el territorio es restringido y parece que son las oscilaciones en el nivel del mar las que afectan, principalmente, la diversidad y estructura de las especies (Grill *et al.* 2007; Gentile *et al.* 2010; Bisconti *et al.* 2011a; Bisconti *et al.* 2011b), más que el cambio en el clima en sí (Salvi *et al.* 2014). Los cambios eustáticos, provocados por la sucesión de periodos Glaciar/Interglaciar, derivan en la alternancia de ciclos de divergencia alopátrica y posterior contacto

secundario. La línea de costa puede cambiar de forma que reduce el área de las islas y fragmenta las poblaciones, o la aumenta, al establecer conexiones con regiones próximas, y, en consecuencia, permite el contacto con biota foránea. Estos sucesos cíclicos desencadenan cambios demográficos y promueven nuevas oportunidades de adaptación con efectos en la arquitectura y variación genética: poblaciones y linajes que se extinguen, alelos perdidos en cuellos de botella y eventos fundadores, mutaciones propagadas por selección y expansión de poblaciones (Hewitt 2004a).

La subida del nivel del mar en el Mediterráneo (*c.* 85 m) acontecida hace 600 Ka (Emig & Geistdoerfer 2004) podría ser el origen de los linajes identificados tanto en *P. pityusensis*, cuyo tiempo de divergencia se estima en 295–89 Ka AP (ADNmt: 295–111 Ka; ADNmt-STRs: 221–89 Ka), como en *P. filfolensis*, cuyo MRCA se data hace *c.* 417 Ka (869–105 Ka). Esta estima del origen de divergencia de *P. filfolensis* es soportada, además, por dataciones posteriores de Salvi *et al.* (2014), que sitúan el MRCA hace *c.* 476 Ka (± 138 Ka) o *c.* 576 Ka (95% HPD: 848–331 Ka), dependiendo de la metodología empleada. En cualquier modo, en ambas especies el origen de la diversidad intraespecífica se sitúa en el Pleistoceno, por lo que es fácil suponer que el aislamiento y la permanencia en refugios independientes en cada isla (Ibiza *vs.* Formentera; Malta *vs.* Gozo), producido por la subida del nivel del mar durante este periodo interglacial, desencadenara el origen de los linajes evidenciados en ambas especies, y correlacionados geográficamente con cada isla.

Las posteriores sucesiones de bajadas del nivel del mar (500 Ka; 150 Ka; MIS 5, 135–85 Ka: 15–20 m y MIS 2, 20 Ka: 120 m) (Emig & Geistdoerfer 2004; Dorale *et al.* 2010), que permiten la unión de las islas de Ibiza y Formentera (separadas por un canal de 50 m), y las subidas de éste (MIS 11, 400 Ka: 55 m; MIS 9, 330 Ka: 35 m; MIS 7, 200 Ka: 8 m) (Butzer 1975; Cuerda 1975), que las aíslan unas de otras, definen la diversidad de las poblaciones de *P. pityusensis*. Este planteamiento también puede aplicarse a *P. filfolensis*, ya que durante las glaciaciones del Pleistoceno los cambios en el nivel del mar no sólo establecen diversas conexiones entre las diferentes islas del Archipiélago Maltés (separadas por 15–20 m de profundidad), sino también entre éstas y Sicilia (Thake 1985; Hunt & Schembri 1999), produciéndose la última conexión con la isla de Sicilia durante el Último Máximo Glaciar, y entre las islas de Malta y Gozo hace 7.2–7 Ka (Furlani *et*

al. 2013). En el Último Máximo Glaciar (MIS 2, 20 Ka AP) el nivel del mar disminuye c. 120 m respecto al nivel actual, conectando las islas de diversos archipiélagos (Dálmata, Aegean,..), no sólo el balear, maltés o el corso-sardo, formando una masa de tierra única que en muchos casos conecta también con el continente (Bisconti *et al.* 2011a). Esta es la última gran conexión entre territorios próximos, en este momento empieza, salvo pequeñas excepciones, el tiempo de aislamiento de las especies del Mediterráneo, que se mantiene en la actualidad.

Para *P. pityusensis* se establece una hipótesis filogeográfica particular para identificar el origen de las discrepancias en el patrón de agrupamiento nuclear y mitocondrial. Esta hipótesis viene dada por la siguiente sucesión de acontecimientos: a) extinción de gran parte de los linajes de Formentera debido a cambios eustáticos; b) recolonización de Formentera por especímenes de Ibiza, durante periodos de regresión marina; c) aislamiento posterior de las islas y de los linajes de Formentera y Ibiza por una nueva subida del nivel del mar; y d) migraciones entre las islas en la siguiente conexión, especialmente de Formentera a Ibiza, donde se produce la captura del ADNmt de Formentera por parte de individuos de Ibiza, posiblemente debido a una ventaja selectiva. En la literatura se ha documentado previamente casos en que se ha demostrado la existencia de introgresión, como resultado de diferencias en la eficacia biológica entre distintos haplogrupos mitocondriales (Niki *et al.* 1989). Bajo esta hipótesis, el tiempo de divergencia estimado por el árbol de especies para *P. pityusensis*, en realidad infiere el aislamiento de poblaciones de Formentera, que previamente habían colonizado la isla de Ibiza. A su vez, esto explicaría por qué la separación de los linajes se sitúa tan alejada del origen de la especie. Ante un fenómeno de introgresión, como éste, la filogenia puede mostrar la historia de dispersión reciente, quedando borrada la señal de eventos previos (Ballard & Whitlock 2004), pues la señal filogenética indica una única colonización (Emerson, 2002).

Once kilómetros separan Córcega de Cerdeña, con una profundidad de 40–70 m, y como en el caso de los otros archipiélagos, los cambios acontecidos en el Pleistoceno conectan y desconectan repetidas veces las islas (Grill *et al.* 2007), con un rasgo adicional, estas islas, de por sí montañosas, con las regresiones marinas incrementan significativamente su altitud (Bisconti *et al.* 2011a). Este escenario refuerza la hipótesis

de que la cadena montañosa que cruza la isla de Córcega podría haber actuado de barrera, aislado diferentes poblaciones hasta originar por vicarianza los linajes observados en la actualidad. En el Último Máximo Glaciar, Cerdeña se ve menos afectada (Grill *et al.* 2007) por las inclemencias climáticas, pero Kuhlemann *et al.* (2005) revelan que el norte y centro de la cadena montañosa corsa presentan glaciares de más de 14 Km de longitud, dividiendo la isla en NE/SO, además de que la región norte es invadida por masas de aire polar, haciendo más pronunciadas las oscilaciones climáticas (Kuhlemann *et al.* 2008). De esta forma, aunque se ha descrito la existencia de “microrefugios” en el norte, por fragmentación y contracciones demográficas en pequeñas áreas con mejores condiciones microclimáticas, el sur de la isla se convierte en un refugio (Bisconti *et al.* 2013). La divergencia de los linajes de Córcega es anterior, en el Mioceno-Plioceno, pero esos procesos, como todos los eventos geológicos, han dejado su huella y, en algunos casos, conducido a la extinción de linajes.

De la misma forma que la geología del Mediterráneo es complicada, también lo es el origen y diversificación de las especies que lo habitan, ya que es orquestado por multitud de eventos y factores que pueden interpretarse, a tiempo pasado, y con la información que llega hasta el presente, bajo diversas hipótesis biogeográficas. Bajo el prisma de los resultados de esta tesis, se propone una hipótesis que establece la secuencia de colonización, especiación y diversificación para las especies *P. pityusensis*, *P. filfolensis* y *P. tiliguerta*, al sintonizarla con los eventos principales acontecidos en la Cuenca Mediterránea. En resumen, *P. tiliguerta* se origina por el aislamiento de sus precursores en el bloque corso-sardo, tras su separación del continente en el Mioceno, mientras que el fin de la Crisis Salina Mesiniense y el restablecimiento de la cuenca, significa el origen de *P. pityusensis* y *P. filfolensis* por mecanismos de vicarianza. Tras la especiación, en todos los casos la interacción de la geomorfología propia de las islas, con los eventos climáticos del Plioceno y Pleistoceno, al desencadenar múltiples colonizaciones o cuellos de botella, sin olvidar la adaptación a hábitats o nichos ecológicos específicos, modulan la diversificación de las tres especies, hasta encontrar los patrones genéticos, morfológicos y de distribución característicos observados en el Holoceno, periodo geológico actual.

CONCLUSIONES

-
1. A partir de *P. lilfordi* se diseña un conjunto de 15 *loci* STRs, que ha sido validado en su especie hermana, *P. pityusensis*, y, 11 de ellos, también en *P. filfolensis*. Estableciendo que, en este caso, la genotipación cruzada dentro de especies del Clado de Islas del Mediterráneo Occidental es factible, permitiendo su uso para inferir patrones genéticos a nivel nuclear.
 2. El análisis de *Podarcis pityusensis*, mediante cinco fragmentos mitocondriales y 15 *loci* microsatélite, indica que esta especie presenta una baja variabilidad genética y una evidente estructura genética correlacionada geográficamente.
 3. En la lagartija de las Pitiusas se observan dos linajes principales, con ciertas discordancias en función del marcador utilizado, en general: uno incluye individuos de las islas o islotes adyacentes a Ibiza, y otro a los de Formentera y las islas de Es Freus, mientras que los individuos de la isla principal de Ibiza se agrupan con el primero a nivel nuclear, y con el segundo a nivel mitocondrial.
 4. El patrón genético observado en *Podarcis pityusensis* sugiere la presencia de un linaje mitocondrial ancestral de “Ibiza”, que ha quedado reducido a algunas localidades de la isla principal, así como a sus islas satélite, desplazado por la introgresión de un linaje de “Formentera”, que se mantiene en Ibiza y algunas de sus islas circundantes.
 5. El tiempo de divergencia estimado entre los linajes identificados en *Podarcis pityusensis* se data hace 295–111 Ka según datos mitocondriales, y hace 221–89 Ka, según estimas que combinan ambos marcadores, nuclear y mitocondrial.
 6. La especie *Podarcis filfolensis* presenta, según análisis con cinco fragmentos mitocondriales, un nuclear y un conjunto de 11 *loci* STR, baja diversidad genética. Esto, junto con la observación del estado de sus poblaciones y los ecosistemas en los que habita, hacen necesario una revisión del estatus de conservación de la lagartija maltesa, clasificada en la actualidad como de “preocupación menor”.
 7. Dos linajes principales, que se corresponden con áreas geográficas, y comparten un ancestro común hace 869–105.4 Ka, son identificados en *Podarcis filfolensis*. Uno

distribuido en la isla de Malta, y otro en Gozo, Comino, islotes circundantes e Islas Pelágicas, sugiriendo que estas últimas islas son fundadas a partir de un precursor perteneciente a este linaje. Sin embargo, dentro del linaje mitocondrial de “Gozo” se perciben dos linajes nucleares con bajos coeficientes de asignación, insinuando una hibridación reciente.

8. Análisis con cinco fragmentos mitocondriales muestran la gran variabilidad genética y profunda estructura genética presentada por *Podarcis tiliguerta*, respaldando la hipótesis de que la especie tirrena es en realidad un complejo de especies, y evidenciando la necesidad de una revisión taxonómica para evaluar esta premisa.
9. Cinco linajes principales son identificados en la lagartija tirrena, que se distribuyen en norte, suroeste y sureste de Córcega, y norte y sur de Cerdeña, los cuales presentan un antecesor común hace 18.83–8.58 Ma.
10. Un total de nueve unidades evolutivas significativas se delimitan *sensu* Moritz (1994) para las especies del Clado de Islas del Mediterráneo Occidental, coincidentes con los linajes principales identificados.
11. La inferencia del árbol de especies estimada a partir de cinco fragmentos mitocondriales e incluyendo los linajes principales de *P. lilfordi*, *P. pityusensis*, *P. filfolensis* y *P. tiliguerta*, así como especímenes de *P. cabonelli*, *P. vaucheri*, *P. hispanica* y *P. muralis*, como *outgroups*, suscribe que las cuatro especies endémicas de los archipiélagos balear, maltés y corso-sardo están incluidas un mismo clado, el Clado de Islas del Mediterráneo Occidental, confirmando resultados previos presentados por Arnold *et al.* (2007).
12. El calibrado del Reloj Molecular con la Crisis Salina Mesiniense permite datar los nodos principales del árbol de “especies”, estimando el origen de diversidad del género *Podarcis* hace 23.41–12.57 Ma.
13. El análisis conjunto de los resultados genéticos obtenidos y su comparación con eventos biogeográficos permite inferir que el precursor de *Podarcis tiliguerta* llega a las islas a través de las conexiones que presenta la microplaca corso-sarda con el

continente durante su rotación y posicionamiento a su contexto actual, y la rotura de la placa en las islas de Córcega y Cerdeña (15–9 Ma AP) supone el origen de los linajes propios de estas islas (18.83–8.58 Ma).

14. La Crisis Salina Mesiniense permite la llegada de los precursores de *P. filfolensis* y *P. lilfordi*-*P. pityusensis* a sus respectivos archipiélagos, iniciándose su especiación y diversificación al término de este evento geológico.
15. Los ciclos climáticos del Pleistoceno derivan en cambios eustáticos que alternan ciclos de divergencia alopátrica y posterior contacto secundario, definiendo así, la estructura y diversidad de las especies del Clado de Islas del Mediterráneo Occidental.

REFERENCIAS

- Advokaat EL, vanHinsbergen DJJ, Maffione M, Langereis CG, Vissers RLM, Cherchi A, Schroeder R, Madani H, Columbus S (2014). Eocene rotation of Sardinia, and the paleogeography of the western Mediterranean region. *Earth and Planetary Science Letters* 183–195.
- Agulló J, Juan A, Guilló A, Alonso M, Crespo M editors. *Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Area: species, communities and landscape level*. 45^o International Congress of SISV & FIP. Cagliari. 2011.
- Akaike H. (1974). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csaki F, editors. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Information Theory*. Budapest, Hungary: Akademia Kiado. p. 267–281.
- Alcover JA (2000). Vertebrate evolution and extinction on western and central Mediterranean islands. *Tropics* 103–123.
- Alcover JA, Sans A, Palmer M (1998). The extent of extinctions of mammals on islands. *Journal of Biogeography* 913–918.
- Alvarez W (1974). Fragmentation of the Alpine orogenic belt by microplate dispersal. *Nature* 248: 309–314.
- Alvarez W (1972). Rotation of the Corsica–Sardinia Microplate. *Nature* 235: 103–105.
- Anderson S, Bankier AT, Barrel GT, deBruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Stande R, Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 457–465.
- Anderson S, deBruijn MH, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *Journal of molecular biology* 156: 683–717.
- Arif IA, Khan HA (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation* 32: 9–17.
- Arnold C. (2008). *Mediterranean Islands*. London: Survival Books.
- Arnold E (1973). Relationships of the Palaearctic lizards assigned to the genera *Lacerta*, *Algyroides* and *Psammotromus* (Reptilia: Lacertidae). *Bull Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 291–366.
- Arnold E (1989). Towards a phylogeny and biogeography of the Lacertidae: relationships within an Old-World family of lizards derived from morphology. *Bull Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 209–251.
- Arnold EN, Arribas Ó, Carranza S. (2007). *Systematics of the Palaearctic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae)*, with descriptions of eight new genera. Auckland: Magnolia Press.
- Arnold EN, Oviden DW. (2002). *A field guide to the reptiles and amphibians of Britain and Europe*. London, UK: Harper Collins Publishers.
- Assunção–Albuquerque MJT, Rey Benayas JM, Rodríguez MÁ, Albuquerque FS (2012). Geographic patterns of vertebrate diversity and identification of relevant areas for conservation in Europe. *Animal Biodiversity and Conservation* 35: 1–11.
- Avice JC (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3–15.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders C (1987). Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 489–522.
- Avice JC, Lansman RA. (1983). Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: Nei M, Koehn RK, editors. *Evolution of genes and proteins*. Sunderland, Mass: Sinauer. p. 147–164.

- Ballard JWO, Whitlock MC (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729–744.
- Bannerman DA, Vella-Gaffiero JA. (1976). Birds of the Maltese archipelago: Museums Department.
- Bauza-Ribot M, Jaume D, Fornos J, Juan C, Pons J (2011). Islands beneath islands: phylogeography of a groundwater amphipod crustacean in the Balearic archipelago. *BMC Evolutionary Biology* 11: 221.
- Bedriaga J (1876). Die Faraglione-Eidechse und die Entstehung der Farben bei den Eidechsen. Heidelberg: Carl Winter: 1–21.
- Bermingham E, Moritz C (1998). Comparative phylogeography: Concepts and applications. *Molecular Ecology* 367–369.
- Bidegaray-Batista L, Arnedo M (2011). Gone with the plate: the opening of the Western Mediterranean basin drove the diversification of ground-dweller spiders. *BMC Evolutionary Biology* 11: 317.
- Bisconti R, Canestrelli D, Colangelo P, Nascetti G (2011a). Multiple lines of evidence for demographic and range expansion of a temperate species (*Hyla sarda*) during the last glaciation. *Molecular Ecology* 5313–5327.
- Bisconti R, Canestrelli D, Nascetti G (2011b). Genetic diversity and evolutionary history of the Tyrrhenian treefrog *Hyla sarda* (Anura: Hylidae): adding pieces to the puzzle of Corsica–Sardinia biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 159–167.
- Bisconti R, Canestrelli D, Salvi D, Nascetti G (2013). A geographic mosaic of evolutionary lineages within the insular endemic newt *Euproctus montanus*. *Molecular Ecology* 143–156.
- Blondel J, Aronson J. (1999). Biology and wildlife of the Mediterranean region. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Blondel J, Aronson J, Bodiou JY, Boeuf G. (2010). *The Mediterranean region: biological diversity in space and time*. New York: Oxford University Press.
- Bloor P, De Laguna IHB, Kemp SJ (2006). Highly polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for the eastern Canary Island lizard, *Gallotia atlantica*. *Molecular Ecology Notes*.
- Bloor P, Rodríguez V, Terrasa B, Brown R, Pérez-Mellado V, Castro J, Picornell A, Ramon M (2011). Polymorphic microsatellite loci for the Balearic Island Lizard *Podarcis lilfordi* (Squamata: Lacertidae). *Conservation Genetics Resources* 3: 323–325.
- Böhm M *et al.*, (2013). The conservation status of the world's reptiles. *Biological Conservation* 372–385.
- Böhme W. (1986). Echsen (Sauria) III (Lacertidae III: *Podarcis*). In. *Handbuch der reptilien und amphibien Europas*. Wiesbaden: Aula.
- Böhme W, Eisentraut M (1981). Vorläufiges Ergebnis eines unter natürlichen Bedingungen angesetzten Kreuzungsversuchs bei Pityusen-Eidechsen, *Podarcis pityusensis* (Bosca, 1883) (Reptilia: Lacertidae). *Bonner zoologische Beiträge* 32: 10.
- Bohonak AJ, Vandergast AG (2011). The value of DNA sequence data for studying landscape genetics. *Molecular ecology* 2477–2479.
- Bologna MA (2004). Introduction: a monitoring project on threatened Italian amphibians and reptiles. *Ital. J. Zool.* 3–8.
- Borg MJ (1989). Aspects of the biology of *Podarcis filfolensis*. [University of Malta.
- Boscà E (1883). Exploración herpetológica de la isla de Ibiza. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural* 12: 241–250.

- Bover P, Quintana J, Alcover JA (2008). Three islands, three worlds: Paleogeography and evolution of the vertebrate fauna from the Balearic Islands. *Quaternary International* 182: 135–144.
- Braccheta G, Mandis G, Pontecorvo C (2007). Contribution to the knowledge of the endemic vascular flora of Sulcis (SW Sardinia – Italy). *Boccone* 155–166.
- Brehm A, Harris DJ, Alves C, Jesus J, Thomarat F, Vicente L (2003). Structure and Evolution of the Mitochondrial DNA Complete Control Region in the Lizard *Lacerta dugesii* (Lacertidae, Sauria). *Journal of Molecular Evolution* 56: 46–53.
- Brito PH, Edwards SV (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica* 135: 439–455.
- Brizzi R, Lanza B (1975). The natural history of the Macinaggio Islets (northeastern Corsica) with particular reference to their herpetofauna. *Natura, Milano* 66: 53–72.
- Bromham L, Penny D (2003). The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics* 4: 216–224.
- Bromham LD, Phillips MJ, Penny D (1999). Growing up with dinosaurs: molecular dates and the mammalian radiation. *Trends Ecol. Evol.* 113–118.
- Brown RP, Pestano J (1998). Phylogeography of skinks (Chalcides) in the Canary Islands inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 7: 1183–1191.
- Brown RP, Tejangkura T, El Mouden EH, Ait Baamrane MA, Znari M (2012). Species delimitation and digit number in a North African skink. *Ecology and Evolution* 2: 2962–2973.
- Brown RP, Terrasa B, Perez-Mellado V, Castro JA, Hoskisson PA, Picornell A, Ramon MM (2008). Bayesian estimation of post-Messinian divergence times in Balearic Island lizards. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 350–358.
- Brown RP, Yang Z (2010). Bayesian Dating of Shallow Phylogenies with a Relaxed Clock. *Systematic Biology* 59: 119–131.
- Brown RP, Yang Z (2011). Rate variation and estimation of divergence times using strict and relaxed clocks. *BMC Evolutionary Biology* 11: 271.
- Brown WM. (1983). Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Nei M, Koehn RK, editors. *Evolution of genes and proteins*. Sunderland, Mass: Sinauer. p. 62–88.
- Brown WM. (1985). The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre RJ, editor. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenum. p. 95–130.
- Brown WM, George MJ, Wilson AC (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967–1971.
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996). Modulation of nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 1004–1010.
- Bruen TC, Philippe H, Bryant H (2006). A Simple and Robust Statistical Test for Detecting the Presence of Recombination. *Genetics* 172: 2665–2681.
- Brundin LZ (1966). Transantartic relationships and their significance, as evidenced by chironomid midges with a monograph of the subfamilies *Podonominae* and *Aphroteninae* and the austral *Heptagylae*. K. Sven. Vetenskapsakad. Handl 1–472.
- Bruschi S, Corti C, Capula M. (2011). *Podarcis tiliguerta* (Gmelin, 1789). In: Corti C, Capula M, Luiselli L, Razzetti E, Sindaco R, editors. *Fauna d'Italia. Reptilia*. Milano: Edizioni Calderini. p. 417–427.
- Bruschi S, Corti C, Carretero MA, Harris DJ, Lanza B, Leviton AE (2006). Comments on the status of the Sardinian-Corsican Lacertid lizard *Podarcis tiliguerta*. *Proceedings-California academy of sciences* 57: 225–245.

- Bruschi S, Corti C, M. C. (2010). *Podarcis tiliguerta* (Gmelin, 1789). In: Corti C, Capula M, Luiselli L, Razzetti E, Sindaco R, editors. Fauna d'Italia. Reptilia. Bologna: Edizioni Calderini de Il Sole 24 Ore Editoria Specializzata S.r.l.
- Buades JM, Rodríguez V, Terrasa B, Pérez-Mellado V, Brown RP, Castro JA, Picornell A, Ramon MM (2013). Variability of the *mc1r* gene in melanic and non-melanic *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis* from the Balearic archipelago. PLoS ONE 8: e53088.
- Butzer KW. (1975). Pleistocene littoral-sedimentary cycles of the Mediterranean basin: a Mallorquin view. In: Butzer KWI, G. L., editor. After the Australopithecines: stratigraphy, ecology and culture change in the Middle Pleistocens. Chicago. p. 25–71.
- Caccone A, Milinkovitch MC, Sbordoni V, Powell JR (1994). Molecular biogeography: using the Corsica-Sardinia microplate disjunction to calibrate mitochondrial rDNA evolutionary rates in mountain newts (*Euproctus*). J. Evo. Biol. 227–245.
- Calsbeek R, Smith TB (2003). Ocean currents mediate evolution in islands lizards. Nature 426: 552–555.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RL, Mulley JC (1993). Incidence and origin of " null" alleles in the (AC) n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 52: 922–927.
- Camargo A, Sinervo B, Sites JWJ (2010). Lizards as model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Molecular Ecology* 3250–3270.
- Cano-Maqueda J, Talavera S, Arista M, Catalán P (2008). Speciation and biogeographical history of the *Campanula lusitanica* complex (Campanulaceae) in the Western Mediterranean region. *Taxon* 57: 1252–1266.
- Capula M (1996). Evolutionary genetics of the insular lacertid lizard *Podarcis tiliguerta*: genetic structure and population heterogeneity in a geographically fragmented species. *Heredity* 77: 518–529.
- Capula M (1994). Evolutionary relationships of *Podarcis* lizards from Sicily and the Maltese Islands. *Journal of Zoology, Systematics and Evolutionary Research* 32: 180–192.
- Capula M (2002). Genetic evidence of natural hybridization between *Podarcis sicula* and *Podarcis tiliguerta* (Reptilia: lacertidae). *Amphibia-Reptilia* 23: 313–321.
- Capula M (1993). Natural hybridization in *Podarcis sicula* and *Podarcis wagleriana* (Reptilia: Lacertidae). *Biochem. System. Ecol.* 21: 373–380.
- Capula M. (2006). *Podarcis filfolensis* (Bedriaga, 1876). In: Sindaco R DG, Razzetti E, Bernini F, editor. Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia. Polistampa, Firenze. p. 466–469.
- Capula M, Nascetti G, Bullini L (1988). Genetic differentiation among species of the genus *Podarcis* (Reptilia, Lacertidae). *Bollettino di Zoologia* 55: 49.
- Carranza S, Amat F (2005). Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula. *Zoological Journal of the Linnean Society* 555–582.
- Carranza S, Arnold EN, R.H. Thomas, J.A. Mateo LFL-J (1999). Status of the extinct giant lacertid lizard *Gallotia simonyi simonyi* (Reptilia: Lacertidae) assessed using mtDNA sequences from museum specimens. 83–86.
- Carranza S, Romano A, Arnold EN, Sotgiu G (2008). Biogeography and evolution of European cave salamanders, *Hydromantes* (Urodela: Plethodontidae), inferred from mtDNA sequences. *Journal of Biogeography* 724–738.

- Carretero MA (2008). An integrated assessment of a group with complex systematics: the Iberomaghrebian lizard genus *Podarcis* (Squamata, Lacertidae). *Integrative Zoology* 247–266.
- Cassar LF, Conrad E, Schembri PJ. (2008). The Maltese Archipelago. In: Vogiatzakis I, Pungetti G, Mannion AM, editors. *Mediterranean Island Landscapes*: Spinger. p. 297–322.
- Cavazza W, Wezel FC (2003). The Mediterranean region-a geological primer. *Episodes* 26: 160–168.
- Cirer AM. (1982). La lagartija ibicenca y su círculo de razas. Estudio introductoria. In: Formentera. CdEiMACIdEi, editor. p. 106.
- Cirer AM (1987). Revisión taxonómica de las subespecies del lacértido *Podarcis pityusensis*, Boscà, 1983. Universitat de Barcelona.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology Notes* 1657–1659.
- Cooper WE, Hawlena D, Pérez-Mellado V (2009). Interactive effect of starting distance and approach speed on escape behavior challenges theory. *Behavioral Ecology* 20: 542–546.
- Cooper WE, Pérez-Mellado V, Hawlena D (2006). Magnitude of food reward affects escape behavior and acceptable risk in Balearic lizards, *Podarcis lilfordi*. *Behavioral Ecology* 17: 554–559.
- Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ (2003). Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163: 367–374.
- Corti C, Böhme W, Delfino M, Massti M (1999). Man and Lacertids on the Mediterranean Islands: conservation perspectives. *Natura Croatia* 18: 287–300.
- Corti C, Lo Cascio P. (1999). I lacertidi italiani: L'epos.
- Corti C, Lo Cascio PL. (2002). The lizards of Italy and adjacent areas. Frankfurt am Main, Germany: Edition Chimaira.
- Corti C, Pérez-Mellado V, Sindaco R, Romano A. (2009a). *Podarcis filfolensis*. In: IUCN, editor. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. www.iucnredlist.org.
- Corti C, Pérez-Mellado V, Sindaco R, Romano A. (2009b). *Podarcis raffonei*. In: IUCN, editor. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. www.iucnredlist.org.
- Cox SC, Carranza S, Brown RP (2010). Divergence times and colonization of the Canary Islands by *Gallotia* lizards. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 747–757.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Tree* 15: 290–295.
- Crutzen PJ (2002). Geology of mankind. *Nature* 415: 23–23.
- Cuerda J. (1975). Los tiempos cuaternarios en Baleares. Palma de Mallorca: Instituto de Estudios Baleáricos.
- Cuttelod A, García N, Abdul Malak D, Temple H, Katariya V. (2008). The Mediterranean: a biodiversity hotspot under threat. In: Vié J-C, Hilton-Taylor C, Stuart SN, editors. The 2008 Review of The IUCN Red List of Threatened Species. Gland, Switzerland: IUCN.
- Cheyilan M, Corti C, Sindaco R, Romano A. (2009). *Podarcis tiliguerta*. In: 2014.2. TIRLoTSV, editor: www.iucnredlist.org.
- Cheyilan M, Poitevin F. (1994). Conservazione di rettili e anfibi. In: Monbailliu X, Torre A, editors. *La Gestione degli Ambienti Costieri E insulari del Mediterraneo*. Alghero: Edizione del Sole. p. 275–336.

-
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 1–29.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *9*: 772.
- Fauna Europaea version 2.6.2 [Internet]. (2013).
- Deidun A (2010). Challenges to the conservation of biodiversity on small islands: the case of the Maltese Islands. *International Journal of Arts and Sciences* 3:175–187.
- Despott G (1915). The reptiles of the Maltese Islands. *The Zoologist* 19: 821–827.
- Dietrich MR (1994). The origins of the Neutral Theory of molecular evolution. *J. Hist. Biol.* 21–59.
- Dorale JA, Onac BP, Fornós JJ, Ginés J, Ginés A, Tuccimei P, Peate DW (2010). Sea-Level Highstand 81,000 Years Ago in Mallorca. *Science* 327: 860–863.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 214.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005). Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185–1192.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.
- Duggen S, Hoernle K, van den Bogaard P, Rupke L, Morgan J (2003). Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature* 422: 602–606.
- Earl D, vonHoldt B (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- Edwards SV (2009). Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution* 63: 1–19.
- Ellegren H, Moore S, Robinson n, Byrne K, Ward W, Sheldon BC (1997). Microsatellite evolution--a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution* 14: 854–860.
- Emerson BC (2002). Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding patterns and process. *Molecular Ecology* 951–966.
- Emig CC, Geistdoerfer P. (2004). The Mediterranean deep-sea fauna: historical evolution, bathymetric variations and geographical changes. In: *Carnets de Géologie/Notebooks on Geology, Article 2004/01 (CG2004 A01 CCE-PG)*.
- Estoup A, Jarnes P, Cornuet JM (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591–1604.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics online* 1: 47–50.
- Fay JC, Wu C-I (2000). Hitchhiking Under Positive Darwinian Selection. *Genetics* 155: 1405–1413.
- Fernández-Palacios JM. (2010). Why islands? In: Pérez-Mellado V, Ramon C, editors. *Islands and Evolution. Maó (Menorca): Institut Menorquí d'Estudis.* p. 85–109.
- Ficetola GF, Padoa-Schioppa E (2009). Human activities alter biogeographical patterns of reptiles on Mediterranean islands. *Global Ecology and Biogeography* 214–222.

- Frankel OH (1974). Genetic conservation: Our evolutionary responsibility. *Genetics*: 53–65.
- Frankham R (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* 311–327.
- Frankham R (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies* 326, Supplement 1: 22–29.
- Frankham R (1995). Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation biology* 9: 792–799.
- Frankham R (1998). Inbreeding and extinction: islands populations. *Conservation Biology* 12: 665–675.
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD. (2002). *Introduction to conservation genetics*: Cambridge University Press.
- Fraser DJ, Bernatchez L (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741–2752.
- Fu J (2000). Toward the phylogeny of the family Lacertidae - Why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 203–217.
- Fu YX (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Fu YX, Li WH (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693–709.
- Fulgione D, Guglielmi S, Odierna G, Rippa D, Caliendo MF, Rastogi RK (2008). Morphological differentiation and genetic structure in island lizard populations. *Zoolog Sci* 25: 465–474.
- Funk DJ, Omland KE (2003). Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 397–423.
- Funk WC, McKay JK, Hohenlohe PA, Allendorf FW (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 489–496.
- Furlani S, Antonioli F, Biolchi S, Gambin T, Gauci R, Lo Presti V, Anzidei M, Devoto S, Palombo M, Sulli A (2013). Holocene sea level change in Malta. *Quaternary International* 288: 146–157.
- Galán P (1999). Demography and population dynamics of the lacertid lizard *Podarcis bocagei* in north-west Spain. *Journal of Zoology* 249: 203–218.
- Garcia-Castellanos D, Estrada F, Jiménez-Munt I, Gorini C, Fernández M, Vergés J, De Vicente R (2009). Catastrophic flood of the Mediterranean after the Messinian salinity crisis. *Nature* 462: 778–781.
- Garcia-Castellanos D, Villasenor A (2011). Messinian salinity crisis regulated by competing tectonics and erosion at the Gibraltar arc. *Nature* 480: 359–363.
- Gardner MG, Cooper SJB, Bull CM, Grant WN (1999). Isolation of microsatellite loci from a social lizard, *Egernia stokesii*, using a modified enrichment procedure. *Journal of Heredity* 301–304.
- Garrido M, Pérez-Mellado V, Cooper WE (2014). Complex relationships amongst parasite load and escape behaviour in an insular lizard. *Ethology*.
- Garza JC, Freimer NB (1996). Homoplasy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Research* 211–217.
- Garza JC, Williamson EG (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 305–318.
- Gassert F, Schulte U, Husemann M, Ulrich W, Rödder D, Hochkirch A, Meyer J, Habel JC (2013). From southern refugia to the northern range margin: genetic population

- structure of the common wall lizard, *Podarcis muralis*. *Journal of Biogeography* 1475–1489.
- Gentile G, Campanaro A, Carosi M, Sbordoni V, Argano R (2010). Phylogeography of *Helleria brevicornis* Ebner 1868 (Crustacea, Oniscidea): Old and recent differentiations of an ancient lineage. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 640–646.
- Gibbard PL, Head MJ, Walker MLJC, Stratigraphy TSoQ (2010). Formal ratification of the Quaternary System/Period and the Pleistocene Series/Epoch with a base at 2.58 Ma. *Journal of Quaternary Science* 25: 96–102.
- Gilbert DA, Lehman N, O'Brien SJ, Wayne RK (1990). Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature* 344: 764–767.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 6715–6719.
- Gillespie JH. (1991). *The causes of Molecular Evolution*. Oxford, UK: University Press.
- Godoy JA (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18: 23–33.
- Goldstein DB, Roemer GW, Smith DA, Reich DE, Bergman A, Wayne RK (1999). The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics* 151: 797–801.
- Grant PRe. (1998). *Evolution on Islands*. Oxford, New York: Oxford University Press.
- Grech R (1999). Aspects of the behaviour of the Maltese wall lizard, *Podarcis filfolensis* in coastal areas. University of Malta.
- Grill A, Casula P, Lecis R, Menken S. (2007). Endemism in Sardinia. In: Weiss S, Ferrand N, editors. *Phylogeography of Southern European Refugia*. Netherlands: Springer. p. 273–296.
- Gueguen E, Doglioni C, Fernandez M (1998). On the post-25 Ma geodynamic evolution of the western Mediterranean. *Tectonophysics* 298: 259–269.
- Guilcher A (1969). Pleistocene and Holocene sea level changes. *Earth-Science Reviews* 69–97.
- Guillaume CP, Cirer AM (1985). Comparació electroforética de diez poblaciones de *Podarcis pityusensis* Boscà , 1882 (Lacertidae) de Ibiza, Formentera e islotes circunvecinos. *Butlletí del Institut Català d'Historia Natural* 52: 197–208.
- Hall T (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hamada H, Petrino M, Kakunaga T (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6465–6469.
- Harris D, Carranza S, Arnold E, Pinho C, Ferrand N (2002). Complex biogeographical distribution of genetic variation within *Podarcis* wall lizards across the Strait of Gibraltar. *Journal of Biogeography* 29: 1257–1262.
- Harris DJ, Arnold EN (1999). Relationships of wall lizards, *Podarcis* (Reptilia: Lacertidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 749–754.
- Harris DJ, Pinho C, Carretero MA, Corti C, Bohme W (2005). Determination of genetic diversity within the insular lizard *Podarcis tiliguerta* using mtDNA sequence data, with a reassessment of the phylogeny of *Podarcis*. *Amphibia Reptilia* 26: 401–407.
- Hasbún C, Gómez A, Köhler G, Lunt D (2005). Mitochondrial DNA phylogeography of the Mesoamerican spiny-tailed lizards (*Ctenosaura quinquecarinata* complex):

- historical biogeography, species status and conservation. *Molecular Ecology* 3095–3107.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T-A (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160–174.
- Hastings WK (1970). Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57: 97–109.
- Hawlena D, Pérez-Mellado V (2009). Change your diet or die: predator-induced shifts in insectivorous liza. *Oecologia* 161: 411–419.
- Hedges SB, Vidal N. (2009). Lizards, snakes, and amphisbaenians (Squamata). In: Hedges SB, Kumar S, editors. *The Timetree of Life*: Oxford University Press. p. 383–389.
- Heled J, Drummond AJ (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* 27: 570–580.
- Heled J, Drummond AJ (2012). Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence time estimation. *Systematic Biology* 61: 138–149.
- Hennig W. (1966). *Phylogenetic systematics*: Univ. Illinois Press, Urbana.
- Hewitt GM (2004a). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359: 183–195.
- Hewitt GM (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hewitt GM (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- Hewitt GM (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 247–276.
- Hewitt GM (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 537–549.
- Hewitt GM (2004b). The structure of biodiversity –insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1: 1–16.
- Hey J (2010a). The divergence of chimpanzee species and subspecies as revealed in multipopulation Isolation-with-Migration analyses. *Molecular Biology and Evolution* 27: 921–933.
- Hey J (2010b). Isolation with Migration models for more than two populations. *Molecular Biology and Evolution* 27: 905–920.
- Hey J (2005). On the Number of New World Founders: A Population Genetic Portrait of the Peopling of the Americas. *PLoS Biology* 3: e193.
- Hey J, Machado CA (2003). The study of structured populations - new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4: 535–543.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriano PF, Yoder AD (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Avise*, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 291–301.
- Holder M, Lewis PO (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics* 4: 275–284.
- Hsü K, Ryan WBF, Cita M (1973a). Late Miocene desiccation of the Mediterranean. *Nature* 240.
- Hsü KJ, Cita MB, Ryan WBF. (1973b). The origin of the Mediterranean evaporites. In: Ryan WBF, Hsü KJ, Cita MB, editors. *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project 13, Part 2*. Washington D.C: U.S. Government Printing Office. p. pp. 1203–1231.

- Hsü KJ, Montadert L, Bernoulli D, Cita MB, Erickson A, Garrison RE, Kidd RB, Mèlierés F, Müller C, Wright R (1977). History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* 267: 399–403.
- Hudson RR (1983). Testing the constant-rate neutral allele model with protein-sequence data. *Evolution* 203–217.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Hunt CO, Schembri PJ (1999). Quaternary environments and biogeography of the Maltese Islands. In: Mifsud, A. and Savona Ventura, C.(eds), *Facets of Maltese prehistory*. The Prehistoric Society of Malta: 243.
- Hurston H, Voith L, Bonanno J, Foufopoulos J, Pafilis P, Valakos E, Anthony N (2009). Effects of fragmentation on genetic diversity in island populations of the Aegean wall lizard *Podarcis erhardii* (Lacertidae, Reptilia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 395–405.
- Huson DH, Bryant D (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and evolution* 23: 254–267.
- Hutchison III CA, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 536–538.
- Huyghe K, Breugelmans K, Small M, Tadic Z, Van Damme R, Vanhooydonck B, Bäckeljau T (2009). Characterization of polymorphic microsatellite markers in the Dalmatian wall lizard *Podarcis melisellensis* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Ecology Resources* 299–301.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* 11.
- Jorde LB, Bamshad M, Rogers AR (1998). Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution. *BioEssays* 20: 126–136.
- Kaliontzopoulou A (2010). Proximate and evolutionary causes of phenotypic diversification: morphological variation in Iberian and North African *Podarcis* wall lizards. University of Barcelona.
- Kaliontzopoulou A, Carretero MA, Llorente GA (2012). Morphology of the *Podarcis* wall lizards (Squamata:Lacertidae) from the Iberian Peninsula and North Africa: patterns of variation in a putative cryptic species complex. *Zoological Journal of the Linnean Society* 173–193.
- Kaliontzopoulou A, Pinho C, Harris DJ, Carretero MA (2011). When cryptic diversity blurs the picture: a cautionary tale from Iberian and North African *Podarcis* wall lizards. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 779–800.
- Karl SA, Castro ALF, Lopez JA, Charvet P, Burgess GH (2011). Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics* 12: 371–382.
- Kass RE, Carlin BP, Gelman A, Neal RM (1998). Markov Chain Monte Carlo in practice: A roundtable discussion. *The American Statistician* 52.
- Kearney M, Shine R, Porter WP (2009). The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 3835–3840.
- Ketmaier V, Giusti F, Caccone A (2006). Molecular phylogeny and historical biogeography of the land snail genus *Solatopupa* (Pulmonata) in the peri-Tyrrhenian area. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 439–451.

- Kimura M, Ohta T (1971). On the rate of molecular evolution. *J. Mol. Evol.* 1–17.
- Kimura M, Ohta T (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75: 2868–2872.
- Kingman JFC (1982a). The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications* 13: 235–248.
- Kingman JFC (1982b). On the genealogy of large populations. *J. App. Prob.* 27–43.
- Kingman JFC (2000). Perspectives. Anecdotal, historical and critical commentaries on Genetics. *Genetics* 1461–1463.
- Kishino H, Thorne JL, Bruno WJ (2001). Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 352–361.
- Knowles LL, Maddison WP (2002). Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623–2635.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6196–6200.
- Kotsakis T (1981). Le Lucertole (Lacertidae, Squamata) del Pliocene, Pleistocene e Olocene delle Baleari. *Bolleti de la Societat d'Història Natural de les Balears* 135–150.
- Krijgsman W (2002). The Mediterranean: *Mare Nostrum* of Earth sciences. 205: 1–12.
- Krijgsman W, Hilgen F, Raffi I, Sierro F, Wilson D (1999). Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400: 652–654.
- Kuhlemann J, Frisch W, Székely B, Dunkl I, Danišić, Krumrei I (2005). Würmian maximum glaciation in Corsica. *Austrian Journal of Earth Sciences* 97: 68–81.
- Kuhlemann J, Rohling EJ, Krumrei I, Kubik P, Ivy-Ochs S, Kucera M (2008). Regional synthesis of Mediterranean Atmospheric circulation during the Last Glacial Maximum. *Science*.
- Lambeck K, Chappell J (2001). Sea Level Change Through the Last Glacial Cycle. *Science* 292: 679–686.
- Lamm KS, Redelings BD (2009). Reconstructing ancestral ranges in historical biogeography: properties and prospects. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 369–382.
- Lande R, Shannon S (1996). The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 434–437.
- Lanfranco G (1970). Notes on *Coluber florulentus algirus* *Maltese Naturalist* 1: 13–15.
- Lanfranco G. (1955). Reptiles, amphibians of the Maltese Islands. In. *Malta Year Book* p. 198–203.
- Lanza B (1973). Gli Anfibi e i Rettili delle isole circumsiciliane. *Lavori Soc. ital. Biogeogr.* 755–804.
- Lanza B (1972). The natural history of the Cerbicale islands (south-eastern Corsica) with particular reference to their herpetofauna. (Storia naturale delle Isole Cerbicale (Corsica sudorientale) con particolare riferimento alla loro erpetofauna). 63: 345–407.
- Lanza B (1976). On a new wall lizard from Corsica, with notes on the Sanguinarie Islands (Reptilia: Lacertidae). *Natura, Milano* 67: 185–202.
- Lanza B (1987). Tutti i serpenti italiani. *Silva* 2: 48–69.
- Lanza B, Brizzi R (1977). The lizard of Piana di Cavallo Island (Southeastern Corsica): *Podarcis muralis contii* subsp. nova (Reptilia: Lacertidae). *Natura, Milano* 68: 157–165.

- Lanza B, Brizzi R (1974). On two new Corsican microinsular subspecies of *Podarcis tiliguerta* (Gmelin, 1789)(Reptilia: Lacertidae). *Natura, Milano* 65: 155–193.
- Lanza B, Cei J (1977). Immunological data on the taxonomy of some Italian lizards (Reptilia Lacertidae). *Monitore Zoologico Italiano* 11: 231–236.
- Lanza B, Corti C (1996). Evolution of the knowledge on the Italian herpetofauna during the 20th century. *Bollettino del museo civico di storia naturale di Verona* 20: 373–436.
- Lanza B, Poggesi M (1986). Storia naturale delle isole satelliti della Corsica. *L' Universo, Firenze* 66: 1–198.
- Lee KN. (2001). Sustainability, Concept and Practice. In: Levin S, editor. *Encyclopedia of Biodiversity*. San Diego: Academic Press. p. 553–567.
- Lescure J, Massary J-Cdc. (2012). *Atlas des Amphibiens et Reptiles de France*. Paris: Mèze & Muséum national d'Histoire naturelle.
- Li W-H. (1997). *Molecular Evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Lo Cascio P, Corti C (2008). Indagini sull'ecologia dei rettili sauri della RNO e del SIC "Isola di Lampedusa". *Naturalista sicil* 32: 319–354.
- Lo Cascio P, Corti C, Capula M. (2011). *Podarcis filfolensis* (Bedriaga, 1876). In: Corti C, Capula M, Luisello L, Razzetti E, Sindaco R, editors. *Fauna d'Italia. Reptilia*. Milano: Edizione Calderini. p. 381–387.
- Lynch M, Pfrender M, Spitze K, Lehman N, Hicks J, Allen D, Latta L, Ottene m, Bogue F, Colbourne J (1999). The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution* 100–110.
- Lynch M, Ritland K (1999). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 1753–1766.
- Mace GM. (1995). Classification of threatened species and its role in conservation planning. In: Lawton JH, May RM, editors. *Extinction Rates*. Oxford: Oxford University Press. p. 198–213.
- Macey JR, Schulte JA, Ananjeva NB, Laron A, Rastegar-Pouyani N, Shammakov SM, Papenfuss TJ (1998). Phylogenetic relationships among Agamid lizards of the *Laudakia caucasia* species group: testing hypotheses of biogeographic fragmentation and an area cladogram for the Iranian Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 118–131.
- Maddison WP, Knowles LL (2006). Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. *Systematic Biology* 55: 21–30.
- Malhotra A, Thorpe RS (2000). The dynamics of natural selection and vicariance in the Dominican anole: patterns of within-island molecular and morphological divergence. *Evolution* 54: 245–258.
- Mangiacotti M, Scali S, Sacchi R, Bassu L, Corti C, Fresi C, Nulchis V, Grazia Satta M. (2011). Do endemic and non endemic lizards compete for space? A case study from two Sardinian lacertids. In: SEH European Congress of Herpetology & DGHT Deutscher Herpetologentag. Luxembourg and Trier 25th t^o 29th September 2011. Luxembourg. p. 112.
- Mannion AM. (2008). The Tertiary-Quaternary environmental history of the Mediterranean basin: the background to Mediterranean island environments. In: Vogiatzakis I, Pungetti G, Mannion AM, editors. *Mediterranean Island Landscapes*: Springer.
- Mannion AM, Vogiatzakis IN (2007). *Island Landscape Dynamics: examples from the Mediterranean*. Geographical Paper.

- Marra AC (2005). Pleistocene mammals of Mediterranean islands. *Quaternary International* 5–14.
- Mayer W, Pavlicev M (2007). The phylogeny of the family Lacertidae (Reptilia) based on nuclear DNA sequences: convergent adaptations to arid habitats within the subfamily Eremiainae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1155–1163.
- Mayr E. (1963). *Animal species and evolution*. London: Harvard University Press; Oxford University Press.
- McNeely J, Miller K, Reid W, Mittermeier R, Werner T. (1990). *Conserving the world's biological diversity*. Washington.
- Médail F, Quézel P (1999). Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. *Conservation Biology* 13: 1510–1513.
- Médail F, Quézel P (1997). Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 112–127.
- Mertens R (1921). Eine neue Eidechse von den Pityusen. *Senckenbergiana* 3: 142–146.
- Metropolis N, Rosenbluth AW, Rosenbluth MN, Teller AH, Teller E (1953). Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics* 21.
- Meulenkamp JE, Sissingh W (2003). Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African–Eurasian convergent plate boundary zone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 196: 209–228.
- Micallef A, Fogliani F, Le Bas T, Angeletti L, Maselli V, Pasuto A, Taviani M (2012). The submerged paleolandscape of the Maltese Islands: Morphology, evolution and relation to Quaternary environmental change. *Marine Geology*.
- Miesfeld R, Krystal M, Amheim N (1981). A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human δ and β globin genes. *Nucleic Acids Research* 9: 5931–5948.
- Morey M, Ruiz-Pérez M. (2008). The Balearic Islands. In: Vogiatzakis I, Pungetti G, Mannion AM, editors. *Mediterranean Island Landscapes*: Springer.
- Moritz C (1999). Conservation Units and Translocations: Strategies for Conserving Evolutionary Processes. *Hereditas* 130: 217–228.
- Moritz C (1994). Defining "Evolutionarily Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 373–375.
- Moritz C (2002). Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Processes That Sustain It. *Systematic Biology* 51: 238–254.
- Moritz C, Dowling TE, Brown M (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 269–292.
- Morrone JJ, Crisci JV (1995). Historical biogeography: Introduction to methods. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 373–401.
- Mouillot F, Paradis G, Andrei-Ruiz M, Quilichini A. (2008). Corsica. In: Vogiatzakis I, Pungetti G, Mannion A, editors. *Mediterranean Island Landscapes*: Springer. p. 220–244.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki S, Horn R, Ehrlich G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Symposium in Quantitative Biology* 263–273.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Neff BD, Gross MR (2001). Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55: 1717–1733.

- Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5269–5273.
- Nielsen R, Beaumont MA (2009). Statistical inferences in phylogeography. *Molecular Ecology* 18: 1034–1047.
- Nielsen R, Wakeley J (2001). Distinguishing Migration From Isolation: A Markov Chain Monte Carlo Approach. *Genetics* 158: 885–896.
- Niki Y, Chigusa SI, Matsuura ET (1989). Complete replacement of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Nature* 551–552.
- Nylander JAA. (2004). MrAIC.pl: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- O'Brien SJ (1994). A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 5748–5755.
- Olden JD, Poff NL (2004). Ecological processes driving biotic homogenization: testing a mechanistic model using fish faunas. *Ecology* 1867–1875.
- Oliverio M, Bologna MA, Mariottini P (2000). Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis Wagler*, 1830 and *Teira Gray*, 1838 (Reptilia, Lacertidae). *Journal of Biogeography* 27: 1403–1420.
- Oliverio M, Bologna MA, Monciotti A, Annesi F, Mariottini P (1998). Molecular phylogenetics of the Italian *Podarcis* lizards (Reptilia, Lacertidae). *Italian Journal of Zoology* 65: 315–324.
- Olson SL. (1989). Extinction on islands: Man as a catastrophe. In: Western D, Pearl MC, editors. *Conservation for the Twenty-First Century*. New York: Oxford University Press. p. 50–53.
- Omodeo P, Rota E (2008). Earthworm diversity and land evolution in three Mediterranean districts. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 59: 65–83.
- Pafilios P, Pérez-Mellado V, Valakos E (2008). Postautotomy tail activity in the Balearic lizard, *Podarcis lilfordi*. *Naturwissenschaften* 95: 217–221.
- Palsbøll PJ, Bérubé M, Allendorf FW (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 11–16.
- Palumbi S. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis DM MC, Mable BK, editor. *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts. p. 205–247.
- Paquette SR, Behncke SM, O'Brien SH, Brenneman RA, Louis EEJ, Lapointe FJ (2007). Riverbeds demarcate distinct conservation units of the radiated tortoise (*Geochelone radiata*) in southern Madagascar. *Conservation Genetics* 8:797–807.
- Pedley HM, House MR, Waugh B. (1978). The geology of the Pelagian Block: the Maltese Islands. In: Nairn AEM, Kanen WH, Stehli FG, editors. *The ocean basins and margins, Vol 4B The western Mediterranean*. London: Plenum Press.
- Penck A, Brückner E (1909). *Die Alpen im Eiszeitalter*. Tarichnithz-Leipzig 1199.
- Pérez-Mellado V. (1998). *Género Podarcis*. In: Salvador A, editor. *Fauna ibérica. Reptiles*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC. p. 242–307.
- Pérez-Mellado V. (2009). *Les sargantanes de les Balears*. Palma de Mallorca.
- Pérez-Mellado V. (2002a). *Podarcis lilfordi*. In: Pleguezuelos JM, Márquez R, Lizana M, editors. *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española.
- Pérez-Mellado V. (2002b). *Podarcis pityusensis*. In: Pleguezuelos JM, Márquez R, Lizana M, editors. *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*.

- Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española.
- Pérez-Mellado V, Garrido M, Ortega Z, Pérez-Cembranos A, Mencía A (2014). The yellow-legged gull as a predator of lizards in Balearic Islands. *Amphibia-Reptilia* 35: 207–213.
- Pérez-Mellado V, Hernández-Estévez JA, García-Díez T, Terrasa B, Ramon MM, Castro JA, Picornell A, Martín-Vallejo FJ, Brown RP (2008a). Factors affecting the density of an endemic reptile, the Balearic Lizard, *Podarcis lilfordi* (Lacertidae, Squamata). *Amphibia-Reptilia* 49–68.
- Pérez-Mellado V, Hernández-Estévez JA, García-Díez T, Terrasa B, Ramon MM, Castro J, Picornell A, Martín-Vallejo J, Brown R (2008b). Population density in *Podarcis lilfordi* (Squamata, Lacertidae), a lizard species endemic to small islets in the Balearic Islands (Spain). *Amphibia-Reptilia* 29: 49–60.
- Pérez-Mellado V, Hernández E, J.A., García D, T., Terrasa B, Ramon MM, Castro J, Picornell A, Martín-Vallejo J, Brown R (2008c). Population density in *Podarcis lilfordi* (Squamata, Lacertidae), a lizard species endemic to small islets in the Balearic Islands (Spain). *Amphibia-Reptilia* 29: 49–60.
- Pérez-Mellado V, Martínez-Solano I. (2009a). *Podarcis lilfordi*. In: IUCN, editor. The Red List of Threatened Species Version 2014.2: www.iucnredlist.org.
- Pérez-Mellado V, Martínez-Solano I. (2009b). *Podarcis pityusensis*. In: IUCN, editor. Red List of Threatened Species Version 2014.2: www.iucnredlist.org.
- Phillips RB, Ehlinger TJ. (1995). Evolutionary and ecological considerations in the reestablishment of Great Lakes Coregonid fishes. In: Nielsen JL, editor. Evolution and the aquatic ecosystem: Defining unique units in population conservation. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society. p. 133–144.
- Pinho C, Corti C, Carretero M, Harris D editors. Fifth International Symposium on the Lacertids of the Mediterranean Basin. 2004 Lipari, Aeolian Islands, Sicily, Italy.
- Pinho C, Ferrand N, Harris DJ (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.
- Pinho C, Harris D, 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, Rocha S, Carvalho BM, Lopes S, Mourao S, Vallinoto M, Brunes TO, Haddad CFB, Gonçalves H, Sequeira F, Ferrand N (2010). New primers for the amplification and sequencing of nuclear loci in a taxonomically wide set of reptiles and amphibians. *Conservation Genetics Resources* 2: 181–185.
- Piras P, Salvi D, Ferraras G, L. M, Delfino M, Pedde L, Kotsakis T (2011). The role of post-natal ontogeny in the evolution of phenotypic diversity in *Podarcis* lizards. *Journal of Evolutionary Biology* 2705–2720.
- Platnick NI, Nelson G (1978). A method of analysis for historical biogeography. *Systematic Zoology* 1–16.
- Podnar M, Mayer W (2005). Can mitochondrial DNA draw the phylogenetic picture of Central Mediterranean island *Podarcis*? *Herpetozoa* 18: 73–77.
- Podnar M, Mayer W, Tvrtkovic N (2005). Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 14: 575–588.
- Portik DM, Wood Jr. PL, Grismer JL, Stanley EL, Jackman TR (2014). Identification of 104 rapidly-evolving nuclear protein-coding markers for amplification across

- scaled reptiles using genomic resources. *Conservation Genetics Resources* 4: 1–10.
- Posada D (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- Poulakakis N, Lymberakis P, Antoniou A, Chalkia D, Zouros E, Mylonas M, Valakos E (2003). Molecular phylogeny and biogeography of the wall-lizard *Podarcis erhardii* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 38–46.
- Primack R. (2006). *Essentials of Conservation Biology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Primmer CR, MØller AP, Ellegran H (1996). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365–378.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pungetti G, Marini A, Vogiatzakis I. (2008). Sardinia. In: Vogiatzakis I, Pungetti G, Mannion A, editors. *Mediterranean Island Landscapes*: Springer. p. 143–168.
- Pyron RA, Burbrink FT, Wiens JJ (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 13.
- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993). Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 285–288.
- Rambaut A, Drummond AJ. (2007). Tracer v. 1.5.
- Rannala B, Yang Z (2003). Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics* 164: 1645–1656.
- Raymond M, Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248–249.
- Reed DH, Frankham R (2001). How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55: 1095–1103.
- Refseth UH, Fangan BM, Jakobsen KSE (1997). Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis* 18: 1519–1523.
- Reilly SB, Marks SB, Jennings WB (2012). Defining evolutionary boundaries across parapatric ecomorphs of Black Salamanders (*Aneides flavipunctatus*) with conservation implications. *Molecular Ecology* 21: 5745–5761.
- Riba i Arderiu O. (1983). Las Islas Baleares en el marco geológico de la Cuenca Mediterránea Occidental durante el Terciario. In: *El Terciario de las Baleares. Guía de las excursiones del X Congreso de Nacional Sedimentología*. Menorca, 26–30 Septiembre.
- Rice WR (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 223–225.
- Rocha S, Harris DJ, Posada D (2011). Cryptic diversity within the endemic prehensile-tailed gecko *Urocotyledon inexpectata* across the Seychelles Islands: patterns of phylogeographical structure and isolation at the multilocus level. *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 177–191.
- Rodríguez V, Brown RP, Terrasa B, Pérez-Mellado V, Castro JA, Picornell A, Ramon MM (2013). Multilocus genetic diversity and historical biogeography of the endemic wall lizard from Ibiza and Formentera, *Podarcis pityusensis* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Ecology* 4829–4841.
- Rodríguez V, Brown RP, Terrasa B, Pérez-Mellado V, Picornell A, Castro JA, Ramon C (2014). Genetic diversity and historical biogeography of the Maltese wall lizard, *Podarcis filfolensis* (Squamata: Lacertidae). *Conservation Genetics* 15: 295–304.

- Rojas M (1992). The species problem and conservation: what are we protecting? *Conservation Biology* 6: 170–178.
- Rosenbaum G, Lister GS, Duboz C (2002). Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. *Journal of the Virtual Explorer*: 107–130.
- Rosenberg NA, Nordborg M (2002). Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 3: 380–390.
- Rosenblum EB, Römler H, Schöneberg T, Hoekstra HE (2010). Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 2113–2117.
- Rosenzweig ML. (1995). *Species Diversity Space And Time*: Cambridge University Press.
- Rouchy JM, Caruso A (2006). The Messinian salinity crisis in the Mediterranean basin: A reassessment of the data and an integrated scenario. *Sedimentary Geology* 35–67.
- Roveri M *et al.*, (2014). The Messinian Salinity Crisis: Past and future of a great challenge for marine sciences. *Marine Geology* 352: 25–58.
- Rozen S, Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz S, editors. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. p. 365–386.
- Runemark A, Garibot M, Bensch S, Svensson E, Martín J, Pafilis P, Valakos ED, Ansson B (2008). Cross-species testing of 27 pre-existing microsatellites in *Podarcis gaigeae* and *Podarcis hispanica* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Ecology Resources* 1367–1370.
- Ryder OA (1986). Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution* 1: 9-10.
- Saint KM, Austin CC, Donnellan SC, Hutchinson MN (1998). C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 259–263.
- Salvador A. (2009a). Lagartija balear – *Podarcis lilfordi*. In: Salvador A, Marco A, editors. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles* (<http://www.vertebradosibericos.org>). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Salvador A. (2006a). Lagartija balear – *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874). In: Carrascal LM, Salvador A, editors. *Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles* (www.vertebradosibericos.org). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Salvador A. (2006b). Lagartija de las Pitiusas – *Podarcis pityusensis* (Boscá, 1883). In: Carrascal LM, Salvador A, editors. *Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles* (www.vertebradosibericos.org). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Salvador A. (2009b). Lagartija de las Pitiusas – *Podarcis pityusensis*. In: Salvador A, Marco A, editors. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Salvador A. (2006c). Lagartija italiana – *Podarcis sicula* (Rafinesque-Schmalz, 1810). In: Carrascal LM, Salvador A, editors. *Enciclopedia virtual de vertebrados españoles* (www.vertebradosibericos.org). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Salvador A. (1984). A taxonomic study of the Eivissa wall lizard, *Podarcis pityusensis* Boscá 1883. In: Kuhn H, Alcover JA, Guerau d' Arellano Tur C, editors.

- Biogeography and ecology of the Pityusic Islands. The Netherlands: Dr W. Junk Publisher. p. 393–427.
- Salvador A, Pleguezuelos JM. (2002). Reptiles españoles: identificación, historia natural y distribución: Talavera de la Reina: Canseco, 2002.
- Salvi D, Bombi P (2010). Reptiles of Sardinia: updating the knowledge on their distribution. *Acta Herpetologica* 5: 161–178.
- Salvi D, Harris DJ, Kaliontzopoulou A, Carretero MA, Pinho C (2013). Persistence across Pleistocene ice ages in Mediterranean and extra-Mediterranean refugia: phylogeographic insights from the common wall lizard. *BMC Evolutionary Biology* 13: 147.
- Salvi D, Schembri PJ, Sciberras A, Harris DJ (2014). Evolutionary history of the Maltese wall lizard *Podarcis filfolensis*: insights on the ‘Expansion–Contraction’ model of Pleistocene biogeography. *Molecular Ecology* 23: 1167–1187.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson MJ, Hufford LE. (1996). *Homoplasy: the reoccurrence of similarity in evolution*. New York: Academic Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 5463–5467.
- Savona Ventura C (1983). The herpetofauna of Comino and satellite islets with a note on the colouration of *Podarcis filfolensis*. *Animalia* 10: 87–93.
- Savona Ventura C (1979). Reptiles and amphibians in Maltese ecology. *Potamon* 1: 14–16.
- Scalera R, Capula M, Fornasari L, Zava B, Bombi P, Mariottini P, Bologna MA (2004). Population structure, genetics and conservation of the Maltese wall lizard, *Podarcis filfolensis*, on Linosa Island (Reptilia, Lacertidae). *Italian Journal of Zoology* 71: 153–159.
- Sciberras A (2007). The presence of *Chamaleo chamaleon* (Reptilia) on the Maltese islands, with a note on the occurrence of this species on Cominotto Island and its possible effects on the endemic local lizard. *Herpetological Bulletin* 102: 38–40.
- Sciberras A, Schembri PJ (2008). Conservation status of the St Paul's Island wall lizard (*Podarcis filfolensis kieselbachi*). *Herpetological bulletin* 28–34.
- Schembri PJ. (1994). Malta's natural heritage. In: Frendo H, Friggieri O, editors. *Malta culture and identity*. Valletta: Malta: Ministry of Youth and the Arts. p. 105–124.
- Schembri PJ. (1993). Physical geography and ecology of the Maltese Islands: A brief overview. In: Busuttill S. LF, Mizzi L. , editor. *Malta: Food, agriculture, fisheries and the environment*. Montpellier: CIHEAM. p. 27–39.
- Schembri PJ, Lanfranco E. (1996). Introduced species in the Maltese Islands. In: Baldacchino AE, Pizzuto A, editors. *Introduction of alien species of flora and fauna (Proceedings of a seminar held at Qawra, Malta, 5 March 1996)*. Floriana, Malta: Environment Protection Department. p. 77.
- Schettino A, Turco E (2006). Plate kinematics of the Western Mediterranean region during the Oligocene and Early Miocene. *Geophysical Journal International* 166: 1398–1423.
- Schlötterer C, Tautz D (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 211–215.
- Schmitt T (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4.
- Schoener TW, Spiller DA, Losos JB (2001). Natural restoration of the species-area relation for a Lizard after a Hurricane. *Science* 294: 1525–1528.

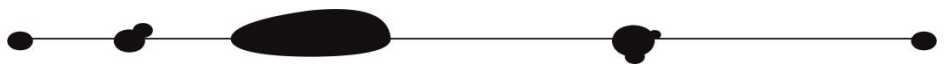
- Schoville SD, Tustall TS, Vredenburg VT, Backlin AR, Gallegos E, Wood DA, Fisher RN (2011). Conservation genetics of evolutionary lineages of the endangered mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa* (Amphibia: Ranidae), in southern California. *Biological Conservation* 144: 2031–2040.
- Schulte U, Hochkirch A, Veith M. (2011). Hybridization between native and introduced populations of the Common wall lizard (*Podarcis muralis*) at the northern range margin. In: SEH European Congress of Herpetology & DGHT Deutscher Herpetologentag. Luxembourg and Trier 25th to 29th September 2011. Luxembourg.
- Schüter U (2005). Die Malta-Eidechse-*Podarcis filfolensis* (Bedriaga, 1876). *Die Eidechse* 16: 1–10.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Selli R (1954). Il Bacino del Metauro. *Giornale di Geologia* 24: 1–294.
- Sly ND, Townsend AK, Rimmer CC, Townsend JM, Latta SC, Lovette IJ (2010). Phylogeography and conservation of the endemic Hispaniolan Palm-Tanagers (Aves: Phaenicophilus). *Conservation Genetics* 11: 2121–2129.
- Smith G (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528–535.
- Smith GR (1992). Introgression in fishes: Significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. *Syst. Biol.* 41–57.
- Speybroeck J, Beukema W, Crochet P-A (2010). A tentative species list of the European herpetofauna (Amphibia and Reptilia)- an update. *Zootaxa* 1–27.
- Stenson AG, Thorpe RS, Malhotra A (2004). Evolutionary differentiation of bimaculatus group anoles based on analyses of mtDNA and microsatellite data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 1–10.
- Stephan W (1989). Tandem-repetitive noncoding DNA: forms and forces. *Molecular biology and evolution* 6: 198–212.
- Suárez E, Barahona A (1996). The experimental roots of the Neutral Theory of molecular evolution. *Hist. Phil. Life Sci.* 55–81.
- Sultana J, Guaci C. (1971). The breeding birds of Malta. In: *Malta Year Book*. p. 329–346.
- Sun L, Paulson KE, Schmid CW, Kadyk L, Leinwand L (1984). Non-Alu family interspersed repeats in human DNA and their transcriptional activity. *Nucleic Acids Research* 12: 2669–2690.
- Tajima F (1983). Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics* 437–460.
- Tajima F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2725–2729.
- Tautz D (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463–6471.
- Tautz D (1993). Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *Progress in Systems and Control Theory* 21–28.
- Tautz D, Renz M (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids. Res.* 12: 4127–4138.

- Taylor SA, Friesen VL (2012). Use of molecular genetics for understanding seabird evolution, ecology and conservation. *Marine ecology progress series* 451: 285–304.
- Templeton AR. (2006). *Population genetics and microevolutionary theory*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Templeton AR (2001). Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* 10: 779–791.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Terrasa B, Pérez-Mellado V, Brown RP, Picornell A, Castro JA, Ramon MM (2009). Foundations for conservation of intraspecific genetic diversity revealed by analysis of phylogeographical structure in the endangered endemic lizard *Podarcis lilfordi*. *Diversity and Distributions* 15: 207–221.
- Terrasa B, Picornell A, Castro JA, Ramon MM (2004). Genetic variation within endemic *Podarcis* lizards from the Balearic Islands inferred from partial cytochrome b sequences. *Amphibia-Reptilia* 25: 407–414.
- Thake M (1985). The biogeography of the Maltese islands, illustrated by the Clausiliidae. *Journal of Biogeography* 269–287.
- Thorne JL, Kishino H, Painter IS (1998). Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 1647–1657.
- Toews DPL, Brelsford A (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21: 3907–3930.
- Torstrom SM, Pangle KL, Swanson BJ (2014). Shedding subspecies: The influence of genetics on reptile subspecies taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76: 134–143.
- The Reptile Database [Internet]. (2014).
- Vähä J-P, Primmer CR (2006). Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* 15: 63–72.
- Van Dyke F. (2008). *Conservation Biology. Foundations, Concepts, Applications*: Springer Science and Business Media B. V.
- Vanhooydonck B, Van Damme R, Aerts P (2000). Ecomorphological correlates of habitat partitioning in Corsican lacertid lizards. *Functional Ecology* 14: 358–368.
- Vasconcelos R, Harris DJ, Carretero MA, Pinho C, Corti C, Capula M, Bassu L, Spano G, Delauguerre M. (2006). Genetic diversity within Corsican and Sardinian specimens of the Tyrrhenian Wall Lizard, *Podarcis tiliguerta*, estimated using mtDNA sequences. In: Corti C, Lo Cascio P, Biaggini M, editors. *Mainland and insular lacertid lizards: a mediterranean perspective*. Firenze: Firenze University Press. p. 199–207.
- Verlaque R, Médail F, Quézel P, Baninot J (1997). Endémisme végétal et paléogéographie dans le bassin méditerranéen. *Geobios, Mémoire spécial* 21: 159–166.
- Vervust B, Grbac I, Van Damme R (2007). Differences in morphology, performance and behaviour between recently diverged populations of *Podarcis sicula* mirror differences in predation pressure. *Oikos* 1343–1352.
- Viada Sauleda C. (2005). *Libro Rojo de los Vertebrados de las Baleares* (3ª edición).
- Vogiatzakis IN, Mannion AM, Pungetti G. (2008). Introduction to the Mediterranean Islands Landscape. In: Vogiatzakis IN, Pungetti G, Mannion AM, editors. *Mediterranean Island Landscapes*: Springer. p. 3–14.

- Wainscoat J (1987). Out of the garden of Eden. *Nature*.
- Wan Q-H, Wu H, Fujihara T, Fang S-G (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25: 2165–2176.
- Waples RS (1991). Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of ‘species’ under the endangered species act. *Mar. Fish. Rev.*: 11–22.
- Weber JL, May PE (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 388–396.
- Weber JL, Wong C (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123–1128.
- Wellenreuther M, Runemark A, Svensson EI, Hansson B (2008). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the Skyros wall lizard *Podarcis gaigeae* (Squamata:Lacertidae). *Permanent Genetic Resources Note* 1005–1008.
- Wheeler QD, Raven PH, Wilson EO (2004). Taxonomy: Impediment or Expedient? *Science* 303: 285.
- Whittaker RJ, Fernández-Palacios JM. (2007). *Island biogeography*. Oxford: Oxford University Press.
- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375–400.
- Wilson EO. (1992). *The Diversity of Life*: Harvard University Press.
- Williamson M. (1997). *Biological Invasions*. London: Chapman & Hall.
- Williamson M (1989). Natural extinctions on islands. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 325: 457–468.
- Yang Z (2007). PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol.* 1586–1591.
- Yule GU (1924). A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J. C. Wills, F. R. S. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biology* 21–87.
- Zalasiewicz J, Williams M, Steffen W, Crutzen P (2010). The New World of the Anthropocene. *Environmental Science & Technology* 2228–2231.
- Zhang D-X, Hewitt GM (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563–584.
- Zieliński P, Nadachowska-Brzyska K, Wielstra B, Szkotak R, Covaciu-Marcov SD, Cogălniceanu D, Babik W (2013). No evidence for nuclear introgression despite complete mtDNA replacement in the Carpathian newt (*Lissotriton montandoni*). *Molecular Ecology* 22: 1884–1903.
- Zink RM (2004). The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271: 561–564.
- Zuckerkindl E, Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel H, editors. *Evolving genes and proteins*. New York: Academic Press p. 97–166.

ANEXOS

ANEXO 1



Anexo 1.
Podarcis pityusensis:
subespecies reconocidas indicando su descripción,
distribución y estatus de conservación
(Salvador 1984, Pérez-Mellado 1998, 2009, Viada Sauleda 2005)

-----IBIZA E ISLAS CIRCUNDANTES-----

***Podarcis pityusensis pityusensis* (Boscà, 1883)**

Descripción: Tiene un tamaño medio y la coloración presenta, en general, tonos verdes o pardos con algún diseño de líneas dorsolaterales claras o manchas terrosas o negras. Es la subespecie que presenta más variabilidad morfológica.

Distribución: Ibiza, Illa Negra, Bosc, Illeta Sal Rossa, Illa d'En Calders, Punta de Sa Ferradura, Illot de Porroig, Illa de Sa Mesquida

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis calaesaladae* (Müller, 1928)**

Descripción: Subespecie de tamaño medio. Las patas posteriores son relativamente largas y la cabeza corta. Presenta un número alto de escamas dorsales. La coloración dorsal es verdosa y la ventral rojiza.

Distribución: Cala Salada.

Evaluación IUCN: datos insuficientes

***Podarcis pityusensis canaretensis* (Cirer, 1980)**

Descripción: Subespecie robusta de extremidades largas. La coloración dorsal es azulada verdosa en los machos y azulada castaño con reflejos verdes en las hembras. El vientre es color azul celeste.

Distribución: Illot d'es Canaret

Evaluación IUCN: datos insuficientes

No incluido en la tesis.

***Podarcis pityusensis canensis* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie grande con cabeza ancha y un número alto de escamas dorsales. El dorso es amarillento-verdoso, con líneas supraciliares conspicuas. El vientre se halla intensamente pigmentado de verde o amarillento, con un patrón conspicuo.

Distribución: Es Canar

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis carlkochi* (Mertens & Müller, 1940)**

Descripción: Subespecie grande de patas posteriores largas y alto número de escamas dorsales, dorso verdoso, costados pardo-grisáceos y vientre blanco o azul claro.

Distribución: Conillera

Evaluación IUCN: datos insuficientes

***Podarcis pityusensis frailensis* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie grande que presenta una cabeza corta y estrecha, alto número de dorsales y coloración melánica.

Distribución: Espardell de s' Espartar

Evaluación IUCN: datos insuficientes

***Podarcis pityusensis gorrae* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie muy grande, de patas posteriores cortas, cabeza corta y estrecha y coloración melánica.

Distribución: Na Bosc y Na Gorra

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis hedwigkammerae* (Müller, 1927)**

Descripción: Subespecie muy grande. Las patas posteriores son relativamente cortas y posee un alto número de escamas dorsales. Tiene coloración melánica y el dorso varía desde el negro grafito al verde muy oscuro.

Distribución: Ses Margalides

Evaluación IUCN: En Peligro Crítico (CR D)

***Podarcis pityusensis hortae* (Buchholz, 1954)**

Descripción: Subespecie de tamaño medio. El vientre es azul claro y el dorso es verdoso y sobre él se dispone un patrón conspicuo de líneas y reticulado que se extiende hasta los costados, grises.

Distribución: S'Hort

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis kameriana* (Mertens, 1927)**

Descripción: Subespecie grande, de patas posteriores cortas y cabeza corta y estrecha. La coloración es de una tonalidad azulada intensa en la región gular, pardoverdosa en el dorso y azul clara en el vientre, con una tendencia parcial al melanismo.

Distribución: Espartar y Escull d'Espartar

Evaluación IUCN: datos insuficientes

***Podarcis pityusensis maluquerorum* (Mertens, 1921)**

Descripción: Subespecie de tamaño corporal grande, patas posteriores y cabeza pequeñas, con elevado número de escamas dorsales y completamente melánica.

Distribución: Bleda Plana y Escull Vermell

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis muradae* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie de tamaño grande. El píleo y las patas posteriores son cortos y posee un alto número de escamas dorsales. El patrón reticulado es ligeramente visible, sobre una coloración dorsal melánica. El vientre es de una tonalidad azul ultramar y/o turquesa.

Distribución: Illa Murada

Evaluación IUCN: En Peligro Crítico [CR B1ac(iv)+2ac(iv)]

***Podarcis pityusensis ratae* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie de forma grande y robusta, con patas posteriores relativamente cortas, número bajo de escamas gulares y una elevada cantidad de dorsales. El diseño dorsal es reducido, con tonos generales claros.

Distribución: Ses Rates

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis redonae* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie de dimorfismo sexual acusado. Las hembras son más gráciles que los machos y muestran un diseño más marcado. Forma fuerte y grande, con patas posteriores relativamente largas y cabeza corta. Posee un alto número de escamas dorsales y gulares. La gular aparece manchada de puntos negruzcos y la ventral es de color rojo ladrillo.

Distribución: Santa Eulària y Redona

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis schreitmuelleri* (Müller, 1927)**

Descripción: Subespecie grande y robusta, con cabeza corta y un alto número de escamas dorsales y gulares. El patrón de diseño está bien marcado. El dorso es verde intenso y la región ventral, rojiza o blanzuca.

Distribución: Malví Gros y Malví Pla

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis tagomagensis* (Müller, 1927)**

Descripción: Subespecie grande, con píleo corto y un alto número de escamas dorsales. El patrón dorsal es reducido y carece de líneas sobre fondo oscuro. El vientre es blanquizco.

Distribución: Tagomago

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis vedrae* (Müller, 1927)**

Descripción: Subespecie grande, con patas posteriores largas y cabeza corta y estrecha. El dorso es amarillento o verdoso, netamente contrastado de los costados, los cuales presentan un color cobalto claro. El vientre es azul ultramar en las partes exteriores y más claro en el centro.

Distribución: Vedrà y Vedranell

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

-----FORMENTERA E ISLAS DE ES FREUS-----

***Podarcis pityusensis formenterae* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie variable en diseño y coloración. El tamaño corporal es medio, las patas posteriores relativamente largas. El dorso es verdoso o pardo, los costados parduscos y el vientre gris claro o anaranjado.

Distribución: Formentera, Espalmador, Espardell, Alga, Porcs, La Savina d'En Forn, y Conill de Formentera.

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis ahorcadosi* (Eisentraut, 1930)**

Descripción: Subespecie grande de patas posteriores relativamente cortas, cabeza ancha y muy corta, y un número pequeño de escamas dorsales. El dorso es verdoso o pardo claro con diseño de bandas claras relativamente reducido y vientre blanquizco.

Distribución: Penjats

Evaluación IUCN: En Peligro Crítico [CR B1ac(iv)+2ac(iv)]

***Podarcis pityusensis caragolensis* (Buchholz, 1954)**

Descripción: Subespecie de tamaño medio. Tiene el dorso de coloración azul verdosa a verde oliva, lo cual contrasta con las bandas supraciliares de tono gris claro. Los costados son pardos con reticulación más oscura y el vientre es amarillento.

Distribución: Caragoler

Evaluación IUCN: En Peligro Crítico [CR D]

***Podarcis pityusensis gastabiensis* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie pequeña con patas posteriores relativamente largas y cabeza larga y ancha. Posee un alto número de escamas dorsales. El dorso y los costados son parduscos, con un patrón de bandas muy reducido o ausente.

Distribución: Castaví

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis negrae* (Eisentraut, 1928)**

Descripción: Subespecie relativamente grande con un alto número de escamas dorsales. El dorso es verdoso y los costados son pardogrisáceos.

Distribución: Negra Nord

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

***Podarcis pityusensis torretensis* (Buchholz, 1954)**

Descripción: Subespecie de tamaño medio. El patrón de diseño está reducido, el dorso es de color pardo gris claro, con líneas claras marcadas en las hembras y verdoso con costados grises y sin diseño en los machos.

Distribución: Torreta

Evaluación IUCN: Vulnerable D2

Anexo 2



Anexo 2.
Podarcis tiliguerta:
subespecies reconocidas indicando su distribución
(Bruschi *et al.* 2011, Lescure & Massary 2012, Uetz & Hosek 2014)

Islas satélite de Córcega

P. t. eiselti presente en Isla Pietricaggiosa, Isla Piana e Islote Maestro María (Archipiélago de las Cerbicali)

P. t. grandisonae en Islote de la Vacca (Archipiélago de las Cerbicali)

P. t. maresi, en los Islotes Toro Piccolo y Toro Grande (Archipiélago de las Cerbicali)

P. t. contii en el Islote de Piana de Cavallo

P. t. rodulphisimonii en los Islotes de Finocchiarola, Mezzo y Terra

P. t. granchii en los Islotes Poraggia Grande y Poraggia Piccola

P. t. pardii en Isla Giraglia

P. t. sammichelii en los Islote de Porro e Islote de Locca (Archipiélago de las Sanguinarie)

Islas circundantes de Cerdeña

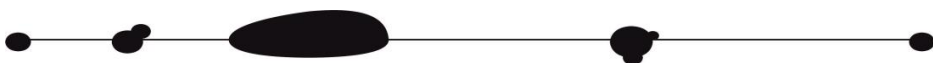
P. t. ranzii se encuentra en Islote Molarotto

P. t. toro en Islote de Toro

Córcega, Cerdeña y resto de islas

P. t. tiliguerta es la subespecie propia del resto del área de distribución

Anexo 3



Anexo 3.
Números de accesos a GenBank
para las secuencias obtenidas en esta tesis

Especie	Espécimen	Acceso a GenBank				
		ARNr 12S	Región Control	ND1-ND2	Citocromo b	C-mos
<i>P. pityusensis</i>	A11	EF694768	EF694794	JX852119	JX852045	-
	A12	EF694768	EF694794	JX852120	JX852045	-
	A13	EF694768	EF694794	JX852121	JX852045	-
	At	EF694768	EF694794	JX852118	JX852051	-
	Bc1	JX852094	EF694794	JX852122	JX852057	-
	Be1	EF694768	EF694794	JX852121	JX852059	-
	Bp2	JX852094	EF694794	JX852123	JX852058	-
	Cg1	EF694768	EF694794	JX852124	JX852060	-
	Cg2	EF694768	EF694794	JX852124	JX852060	-
	Cg3	EF694768	EF694794	JX852124	JX852060	-
	Cn12	JX852094	EF694794	JX852122	JX852063	-
	Cs1	EF694768	EF694794	JX852121	JX852086	-
	Dg1	JX852094	EF694794	JX852122	JX852091	-
	Dg2	EF694768	EF694794	JX852121	JX852093	-
	Dg3	JX852094	EF694794	JX852122	JX852091	-
	E1	EF694768	EF694794	JX852121	JX852050	-
	E2	EF694768	EF694794	JX852121	JX852050	-
	E3	JX852094	JX852099	JX852125	JX852053	-
	E4	EF694768	JX852099	JX852121	JX852049	-
	E5	JX852094	EF694794	JX852122	JX852056	-
	Ea3	EF694768	EF694794	JX852135	JX852050	-
	Ed1	JX852094	EF694794	JX852122	JX852067	-
	Ee3	JX852094	EF694794	JX852126	JX852064	-
	El1	EF694769	EF694794	JX852121	JX852045	-
	El4	EF694768	EF694794	JX852121	JX852045	-
	El5	JX852095	EF694794	JX852121	JX852045	-
	Ep3	JX852094	EF694794	JX852122	JX852066	-
	Ep6	JX852094	EF694794	JX852122	JX852065	-
	Er2	EF694768	EF694794	JX852121	JX852048	-
	Er3	EF694768	EF694794	JX852121	JX852048	-
	Er4	JX852096	EF694794	JX852121	JX852054	-
	Er5	EF694768	EF694794	JX852121	JX852055	-
	Ev	JX852094	EF694794	JX852123	JX852058	-
	Ft1	EF694768	EF694794	JX852121	JX852045	-
	Ft2	EF694768	EF694794	JX852127	JX852045	-
	Ft3	EF694768	EF694794	JX852121	JX852045	-
	Ft4	EF694768	EF694794	JX852121	JX852045	-
	Ft5	EF694768	EF694794	JX852128	JX852045	-
	Fx1	EF694768	EF694795	JX852129	JX852052	-
	Fx2	EF694768	EF694794	JX852129	JX852046	-
	Fx3	EF694768	EF694794	JX852129	JX852051	-
	Fx4	EF694768	JX852100	JX852129	JX852047	-
	G1	EF694768	EF694794	JX852121	JX852061	-
	G2	EF694768	EF694794	JX852121	JX852062	-
	G3	EF694768	EF694794	JX852121	JX852062	-
	Im1	JX852094	EF694794	JX852118	JX852068	-
	Im2	JX852094	EF694794	JX852118	JX852068	-
	In1	JX852094	EF694794	JX852130	JX852069	-
	In2	JX852094	JX852101	JX852131	JX852070	-
	In3	JX852094	EF694794	JX852131	JX852070	-
Ip1	EF694768	EF694794	JX852133	JX852073	-	
Ip2	JX852097	JX852102	JX852121	JX852074	-	
Ip3	EF694768	JX852102	JX852121	JX852075	-	
Ma2	JX852094	EF694794	JX852122	JX852087	-	

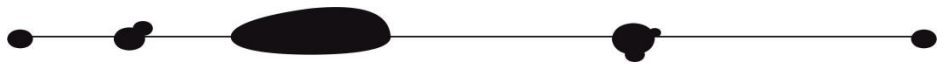
Ms3	JX852094	EF694794	JX852122	JX852089	-
Mu1	JX852094	JX852102	JX852122	JX852092	-
Mu2	JX852094	EF694794	JX852122	JX852092	-
Mu3	JX852094	EF694794	JX852122	JX852092	-
Nb5	JX852094	JX852108	JX852122	JX852090	-
Ng3	EF694768	EF694794	JX852121	JX852076	-
Nn1	EF694768	EF694794	JX852132	JX852071	-
Nn2	EF694768	EF694794	JX852132	JX852072	-
Nn3	EF694768	EF694794	JX852132	JX852072	-
Nf4	EF694768	EF694794	JX852121	JX852072	-
P1	EF694768	EF694794	JX852121	JX852077	-
P2	EF694768	EF694794	JX852121	JX852078	-
P3	EF694768	EF694794	JX852121	JX852078	-
Sc1	EF694768	EF694794	JX852134	JX852079	-
Sc2	EF694768	JX852103	JX852124	JX852045	-
Sc3	EF694768	EF694794	JX852124	JX852080	-
Sh2	JX852094	EF694794	JX852137	JX852088	-
Sp1	EF694768	JX852104	JX852121	JX852081	-
Sr1	JX852098	EF694794	JX852122	JX852091	-
Tg5	JX852094	EF694794	JX852136	JX852064	-
Tr4	EF694768	JX852105	JX852121	JX852045	-
Tr5	EF694768	JX852105	JX852121	JX852082	-
Tr6	EF694768	JX852106	JX852121	JX852083	-
V3	EF694768	JX852107	JX852121	JX852084	-
Vd8	EF694768	EF694794	JX852121	JX852085	-
Vx1	JX852094	EF694794	JX852121	JX852076	-
Vx2	EF694768	EF694794	JX852121	JX852076	-
Vx3	EF694768	EF694794	JX852121	JX852076	-
Vx4	EF694768	EF694794	JX852121	JX852076	-
Vx5	EF694768	EF694794	JX852121	JX852076	-

Especie	Espécimen	ARNr 12S	Región Control	ND1-ND2	Citocromo b	C-mos
<i>P. filifolensis</i>	B1	KF022049	JX852109	KF022067	KF022052	KF022080
	B2	KF022049	JX852109	KF022068	KF022053	KF022080
	M1	KF022049	KF022079	KF022069	KF022054	KF022081
	M2	KF022049	KF022079	KF022069	KF022054	KF022081
	M3	KF022049	KF022079	KF022069	KF022054	KF022081
	M4	KF022049	KF022079	KF022069	KF022054	KF022081
	M5	KF022049	KF022079	KF022069	KF022054	KF022081
	C1	JX852115	JX852109	KF022070	KF022055	KF022082
	C2	JX852115	JX852109	KF022071	KF022056	KF022083
	C3	JX852115	JX852109	KF022072	KF022057	KF022080
	C4	KF022051	JX852109	KF022073	KF022058	KF022080
	C5	JX852115	JX852109	JX852138	JX852112	KF022083
	G0	JX852115	JX852109	KF022074	KF022059	KF022080
	G1	JX852115	JX852109	KF022073	KF022060	KF022083
	G2	JX852115	JX852109	KF022073	KF022060	-
	G3	JX852115	JX852109	KF022075	KF022061	KF022080
	G4	JX852115	JX852109	KF022075	KF022062	KF022080
	G5	JX852115	JX852109	KF022076	JX852112	KF022080
	G6	JX852115	JX852109	KF022075	KF022061	KF022084
	G7	JX852115	JX852109	KF022073	KF022063	KF022084
	G8	KF022050	JX852109	KF022073	KF022063	-
	CTT1	JX852115	JX852109	KF022073	KF022064	KF022080
	CTT2	JX852115	JX852109	KF022073	KF022064	KF022082
	CTT3	JX852115	JX852109	KF022073	KF022064	KF022082
CTT4	JX852115	JX852109	KF022073	KF022064	KF022085	

	CTT5	JX852115	JX852109	KF022073	KF022064	KF022080
	CTG1	JX852115	JX852109	KF022077	KF022059	-
	CTG2	JX852115	JX852109	KF022077	KF022059	-
	CTG3	JX852115	JX852109	KF022071	KF022059	KF022080
	CTG4	JX852115	JX852109	KF022073	KF022065	KF022080
	CTG5	JX852115	JX852109	KF022078	KF022059	-
	LIM	JX852115	JX852109	KF022073	KF022059	-
	LAM	JX852115	JX852109	KF022073	KF022066	-
Especie	Espécimen	ARNr 12S	Región Control	ND1-ND2	Citocromo b	C-mos
<i>Podarcis tiliguerta</i>	TCO1	KM58868	KM58849	KM58818	KM58783	-
	TCO2	KM58869	KM58850	KM58819	KM58784	-
	TCO3	KM58870	KM58851	KM58820	KM58785	-
	TCO4	KM5887	KM58852	KM58821	KM58786	-
	TCO5	KM58872	KM58853	KM58822	KM58787	-
	TCO6	KM58872	KM58854	KM58823	KM58788	-
	TCO7	KM58873	KM58855	KM58824	KM58789	-
	TCO8	KM58874	KM58855	KM58825	KM58790	-
	TCO9	KM58875	KM58856	KM58826	KM58791	-
	TCO10	KM58876	KM58857	KM58827	KM58792	-
	TCO11	KM58877	KM58858	KM58828	KM58793	-
	TCO12	KM58868	KM58859	KM58829	KM58794	-
	TCO13	KM58878	KM58859	KM58829	KM58795	-
	TCO14	KM58868	KM58859	KM58829	KM58796	-
	TCO17	KM58868	KM58860	KM58830	KM58797	-
	TCO18	KM58879	KM58856	KM58831	KM58798	-
	TCO19	KM58877	KM58861	KM58828	KM58799	-
	TCO20	KM58868	KM58849	KM58818	KM58800	-
	TCO21	KM58868	KM58860	KM58832	KM58815	-
	TSA1	KM58880	KM58862	KM58833	KM58801	-
	TSA2	KM58881	JX852111	KM58834	KM58802	-
	TSA3	KM58880	KM58862	KM58835	KM58803	-
	TSA4	KM58881	JX852111	KM58836	KM58804	-
	TSA5	KM58882	JX852111	KM58837	KM58805	-
	TSA8	KM58880	KM58867	-	KM58813	-
	TSA10	KM58881	JX852111	KM58838	KM58806	-
	TSA11	KM58883	KM58863	KM58839	KM58807	-
	TSA12	KM58884	KM58864	KM58840	KM58808	-
	TSA13	KM58886	KM58864	KM58841	KM58809	-
	TSA15	KM58885	KM58865	KM58842	KM58810	-
	TSA17	KM58881	JX852111	KM58834	KM58802	-
	TSA18	KM58884	KM58864	KM58843	KM58811	-
	TSA19	KM58884	KM58864	KM58843	KM58811	-
TSA20	KM58885	KM58866	KM58844	KM58812	-	
Tp1	JX852117	JX852111	KM58847	KM58817	-	
Tp2	JX852117	JX852111	KM58847	KM58817	-	
Tp3	JX852117	JX852111	KM58847	KM58817	-	
Tf1	JX852116	JX852110	KM58845	KM58816	-	
Tf2	JX852116	JX852110	KM58846	KM58814	-	
Tf3	JX852116	JX852110	KM58845	KM58814	-	
Ts1	JX852117	JX852111	KM58848	KM58817	-	
<i>P. sicula</i>	SIG1	KT30722	KT30720	KT30717	KT30714	-
	SIL2	KT30722	KT30721	KT30718	KT30715	-
	SIN3	KT30722	KT30720	-	KT30716	-
	SIO5	KT30722	KT30720	KT30719	KT30716	-

<i>P. carbonelli</i>	CAR	KT30681	KT30679	KT30677	KT30675	-
	CL1	KT30682	KT30680	KT30678	KT30676	-
<i>P. muralis</i>	MPC5	KT30713	KT30711	KT30709	KT30707	-
	MLP1	KT30712	KT30710	KT30708	KT30706	-
<i>P. hispanica</i>	HB2	KT30701	KT30695	KT30689	KT30683	-
	HJ2	KT30702	KT30696	KT30690	KT30684	-
	HF9	KT30702	KT30697	KT30691	KT30685	-
	HL1	KT30703	KT30698	KT30692	KT30686	-
	HD1	KT30704	KT30699	KT30693	KT30687	-
	HC1	KT30705	KT30700	KT30694	KT30688	-
<i>P. vaucheri</i>	VXF6	KT30729	KT30727	KT30725	KT30723	-
	VO1	KT30730	KT30728	KT30726	KT30724	-

Anexo 4



Anexo 4.
Frecuencias alélicas de 15 *loci* STRs
en *P. lilfordi*, *P. pityusensis* y *P. filfolensis*

alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filifolensis</i>	<i>P. liifordi</i>	alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filifolensis</i>	<i>P. liifordi</i>
Pli2				Pli10			
212	1			227		60	
220	1			247	2		6
228	3		3	251	4		
232	8		1	253	2		2
236	12		2	255	15		15
240	6		1	257			4
242	1		1	259	18		36
244	5		4	261	3		2
248	4		12	263	35		39
250			1	265	3	2	2
252	11		15	267	20		21
254			1	269	3		3
256	8	2	18	271	10		4
258		2	1	273	1		5
260	10		27	275	16		2
264	4	3	21	277	3		
266	1	7	3	279	6		
268	10		18	283	1		4
270			2	295	8		
272	6		10				
276	17	1	4	Pli12			
280	11	8	5	164			2
284	13	4	2	168	3		1
288	9	5	3	170	10		
292	1	4	1	174			2
294	4			176	22		5
296	1			178	43		3
298		1		188		1	1
302				190		6	
304		2		192			3
306		1		196		1	4
310	1	2	2	198		4	10
Pli3				200		2	7
225	2		1	202			9
231			3	204		14	
233			1	206	2	2	12
235	2		6	208			3
237			1	210			19
239	6		3	212	1	5	5
241			3	214	2		13
243	6		3	216	2		3
245			1	218	1		4
				220	8	7	1

alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filfolensis</i>	<i>P. lilfordi</i>	alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filfolensis</i>	<i>P. lilfordi</i>
247	13	4	1	222			1
249			3	224	14		11
251	42		33	226			2
253			4	228	8	3	9
255	35	12	39	232	1	1	
259	26	18	32	236	1		3
263	12	11	11	238	4	1	2
267	7	7		240		1	
269			3	242	10		1
271	1	4		246	4		
				248		4	
				250			1
				254	2	2	
				262			1
				268			2
Pli4				Pli16			
312	1			402			2
316	5			414	2		
320	4			416			2
324	7			418			2
328	13			426			1
332	18			428	6		
336	8			430			3
340	4			432	2		4
344	6		2	436			8
346	1			440	1		5
352	1			444	5		15
354			1	448	12		15
358			1	452	13		22
360	1		3	454			1
364	6		1	456	19		21
366	2		5	458			3
368			1	460	38		17
370	7		9	462	4		4
372	3		9	463	12		7
374	11		10	464	11		1
376	15	1	24	466	9		1
378	2		5	468	11		1
380	10	1	20	470	2		3
382			8	472	2		4
384	6	5	12	474			1
386	1		1	476	2		
388	13	2	3	478			
390		3	9	480	1		1
392	3		4				
394		8	3				
396	2	3	4				
398		7					
400	2	8	3				
402		2					
404	1	5	5				

alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filfolensis</i>	<i>P. lilfordi</i>	alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filfolensis</i>	<i>P. lilfordi</i>
406	1	6	4	Pli17			
408			1	229			1
410		2	1	231			2
412		4	2	233	1	1	
416			7	235		3	4
420		2		239		1	9
460		1		243	16	2	20
Pli5				245		2	
358			10	247	25	3	30
362			12	249		1	
364	2			251	27		32
366	19		17	255	23	1	17
368	1			257		3	1
370	1		4	259	30	4	12
372			3	261	14	1	
376/377	6		8	263	1	4	3
378	1			265	6	4	2
380	23		21	267		3	
384	41		23	269	5	4	
388	36		37	271		1	2
390	2			273		1	
392	15		12	275		1	1
394	6		4	277		3	
398	1		3	289		1	
402			4	Pli18			
Pli6				109			4
362	1			113	2		
370	1		1	115	2	2	
372	1			119	5		2
374	3		3	123	16	2	18
378	6		6	125		1	1
380	12		2	127	11	6	18
382	3	1	2	129	2		2
384	6		1	131	20	3	29
386	2		1	135	12	12	20
388	16			137	2		
390	1	4	3	139	21	8	23
392	32		1	141			1
394	8		1	143	14	12	21
396	16			147	12	4	6
398	10		12	149	1		
400	18	3	3	151	6	5	10
402	3	1	30	155	4	1	7
404	9	8	4	159	6	2	
				163	3	4	

alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filfolensis</i>	<i>P. lilfordi</i>	alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filfolensis</i>	<i>P. lilfordi</i>
406			45	167	2		
408	2	5	3	171	4		
410		6	19	175	5		
412		11	2	Pli21			
414			3	114	1	3	
416		15	1	118	1		1
418	1		1	120		1	
420		4	2	126	1	1	
422	1		2	128		6	4
Pli8				130	1	1	2
113	2			132		8	4
125	7		1	137	3	2	6
127	2			138		9	11
131	5		1	142	7	1	6
133	4		3	146	9	14	9
135	1			150	24	1	8
139	20		3	154	27	6	15
143	20		22	158	22		11
147	30		35	162	16		21
149			1	166	11		21
151	33		35	170	11		5
155	10		16	174	2		1
159	2		5	176			2
163	8		3	180	11		4
167			3	184	4		
169	2		1	188			5
171			1	196		1	2
173	2			208	1		
175			4	Pli22			
179			1	103		2	2
181			2	105			
183			2	107	1	41	32
187			1	111		11	12
Pli9				113	2		2
331		1		115	106	4	58
353		4		117	2		
355	5	8		119	10	1	42
361		47		123	11	2	6
365			4	127	7	1	1
369	7		1	131	3		
371			1	135	3		
373			6	137	1		
379	2			Pli24			
381	8		13	102			2
385	15		10	104			7

alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filfolensis</i>	<i>P. lilfordi</i>	alelo	<i>P. pityusensis</i>	<i>P. filfolensis</i>	<i>P. lilfordi</i>
389	30		26	107			2
393	40		19	108			21
395			5	110			9
397	14		43	112	1		23
399			1	114			3
401	5		6	116			32
403			1	120	25		26
405	3			122	9		
407			4	124	9		16
409	8		1	126	4		
411			1	128	41		4
415	1			132	37		2
426			1	136	17		4
429			1	140	1		
431			2	152			3
435	2						

*En negrita, alelos secuenciados.

*Si vas a emprender el viaje hacia Ítaca
pide que tu camino sea largo,
rico en experiencias, en conocimiento.*

*A Lestrigones y a Ciclopes
o al airado Poseidón nunca temas,
no hallarás tales seres en tu ruta
si alto es tu pensamiento y limpia
la emoción de tu espíritu y tu cuerpo.*

*A Lestrigones ni a Ciclopes
ni al fiero Poseidón hallarás nunca,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no es tu alma
quien ante ti los pone.*

*Pide que tu camino sea largo.
Que numerosas sean
las mañanas de verano
en que con placer, felizmente
arribes a bahías nunca vistas;
detente en los emporios de Fenicia
y adquiere hermosas mercancías,
madreperla y coral, ámbar y ébano,
aromas deliciosos y diversos,
cuanto puedas invierte en
voluptuosos y delicados perfumes;
visita muchas ciudades de Egipto
y con avidez aprende de sus sabios.*

*Ten siempre en la memoria a Ítaca.
Llegar allí es tu meta.
Mas no apresures el viaje.
Mejor que se extienda largos años
y en tu vejez arribes a la isla
con cuanto hayas ganado en el camino,
sin esperar que Ítaca te enriquezca.
Ítaca te regaló un hermoso viaje,
sin ella el camino no hubieras emprendido,
mas ninguna otra cosa puede darte.*

*Aunque pobre la encuentres,
Ítaca no te engañó.
Rico en saber y en vida
como has vuelto,
comprendes ya
qué significan las Ítacas.*

*Viaje a Ítaca
Konstantino Kavafis*



**Govern
de les Illes Balears**



Unión Europea

Fondo Social Europeo
"El FSE invierte en tu futuro"