Anexo I

D. José Manuel Vergara Martín, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en sesión permanente tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "**Filogeografía y actual flujo genético entre las poblaciones del lagarto canarión Gallotia stehlini**" presentada por la doctoranda D^a Irma Esther Herrera Bravo de Laguna y dirigida por los Doctores D. Richard Brown y D. José Juan Pestano Brito.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Art^o 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 9 de septiembre de dos mil quince.



Departamento: BIOLOGÍA

Programa de doctorado: MEDIO AMBIENTE

Título de la Tesis

FILOGEOGRAFÍA Y ACTUAL FLUJO GENÉTICO ENTRE LAS POBLACIONES DEL LAGARTO CANARIÓN *GALLOTIA STEHLINI*

Tesis Doctoral presentada por Dª. Irma Esther Herrera Bravo de Laguna

Dirigida por el Dr. D. Richard Brown

Codirigida por el Dr. D. José J .Pestano Brito

El Director

÷ ,

El Codirector

La Doctoranda

Las Palmas de Gran Canaria, 2015



TD-2 AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DE TESIS¹

(Artículo 8º RTD)

DATOS DE LOS DIRECTORES DE TESIS²

NIF:	PRIMER APELLIDO: Brown	SEGUNDO APELLIDO:	NOMBRE: Richard
NIF:	PRIMER APELLIDO:	SEGUNDO APELLIDO:	NOMBRE:
42.059,571 T	Pestano	Brito	José J.

AUTORIZAN la presentación de la tesis doctoral a D.

DATOS PERSONALES DEL DOCTORANDO

PRIMER APELLIDO:	SEGUNDO APELLIDO:	NOMBRE:
Herrera	Bravo de Laguna	Irma Esther
D.N.I./PASAPORTE:	TELÉFONOS DE CONTACTO	
42867038Y	928644359- 638493342	

DATOS ACADÉMICOS DEL DOCTORANDO

Departamento/Facultad/Instituto: BIOLOGÍA

Título del programa de doctorado: Medio Ambiente

Bienio/Curso Académico: 1996-1998

Título de la Tesis Doctoral: Filogeografía y actual flujo genético entre las poblaciones del Lagarto Canarión Gallotia stehlini

Para obtener el título de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Las Palmas de Gran Canaria, a 9 de septiembre de 2015.

Firma de los Directores de la Tesis

CO	NFO	RM	DAD

Firma del Dırector del Órgano responsable del Programa de Doctorado⁴

Dr.Richard Brown

Dr.J.J.Pestano Brito

Fecha del Registro de la Entrada de la Tesis Doctoral en el Servicio de Investigación y Tercer Ciclo

Nº de Registro

¹ VER INSTRUCCIONES AL DORSO

Agradecimientos

Éste ha sido un trabajo de muchos años, el cual me ha permitido profundizar en el conocimiento de la metodología científica aplicada a mi campo de investigación, desde las técnicas básicas de cualquier laboratorio de Biología Molecular, hasta los últimos programas desarrollados en Bioinformática para el análisis de los resultados. Así mismo ha sido una gran oportunidad para conocer el mundo académico post-graduación.

Por todo ello, quiero hacer mención a las siguientes personas que han participado, de algún modo en este gran proyecto que ha sido mi Tesis Doctoral.

A mi familia: principalmente " \mathcal{A} ellas", apoyándome incondicionalmente en todo momento.

Al Dr. Miguel Lizana Avia (Universidad de Salamanca), por haberme sabido aconsejar sabiamente y haber sido un gran profesor durante mi carrera.

Al Dr. L.R.Noble (Universidad de Aberdeen, UK) por haberme aceptado en su laboratorio del Departamento de Zoología y especialmente a la Dra. Lorna MacLean que me enseñó la disciplina y profesionalidad necesaria en un laboratorio de Biología Molecular.

Al Dr. R.Butlin (Universidad de Leeds, UK) y a la Dra. Tania King, en cuyo laboratorio de genética molecular realicé mi Suficiencia Investigadora, financiada por una beca "Marie Curie Training Site Fellowship".

Al Dr. Roberto Mioso (Universidad Federal de Recife, Brasil), por su inestimable colaboración en el trabajo de campo de esta tesis: 6 meses, y cerca de 500 animales trampeados.

Al Dr. J.J.Pestano Brito (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria) por haber aceptado ser codirector de mi tesis y haberme facilitado la financiación e instalaciones de laboratorio necesarias para los análisis genéticos de la tesis.

Al Dr. Richard Brown (Universidad de John Moores de Liverpool, UK), como director de mi tesis, por el seguimiento constante, horas de trabajo

personal y en definitiva tutela académica ejercida con mi tesis. Mi sincera gratitud.

Finalmente, agradecer al CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) por haberme concedido una beca modalidad Doutorado no Exterior-GDE, Processo número: 200722/2014-0, para la conclusión de esta tesis doctoral.

Irma

A la memoria de mi madre y a mis hijas: Paola & Amaya

Índice

1.	CAPÍTULO 1: Introducción general	1
	1.1. Filogeografía: conceptos generales	2
	1.2. Biotas insulares: importancia en los estudios	
	sobre Evolución	3
	1.3. Gran Canaria: aspectos geológicos y ecológicos	7
	1.4. Gallotia stehlini (Schenkel, 1901): descripción de	
	la especie	13
	1.5. Objetivos	19
2.	CAPÍTULO 2: ADN mitocondrial	21
	2.1. Introducción	22
	2.2. Material y métodos	23
	2.2.1. Trabajo de campo	23
	2.2.2. Aislamiento del ADN genómico	25
	2.2.3. Amplificación	26
	2.2.4. Secuenciación	27
	2.2.5. Análisis de las secuencias de ADN	
	2.2.6. Reconstrucción filogenética	29
	2.3. Resultados	31
	2.3.1. Datos morfológicos	31
	2.3.2. Diversidad haplotípica	32
	2.3.3. Reconstrucción filogenética	34
	2.4. Discusión	44
3	. CAPÍTULO 3: ADN nuclear	47
	3.1. Microsatélites	48
	3.2. Aplicaciones y limitaciones	49
	3.3. Material y métodos	50
	3.3.1. Amplificación de los microsatélites	50
	3.3.2. Análisis de los datos genéticos	52

3.3.2.1. Diversidad genética	52
3.3.2.2. Diferenciación y estructura poblacional	52
3.4. Resultados	53
3.4.1. Características de los microsatélites y desviaciones de	
HWE	53
3.4.2. Estructura poblacional: estadística descriptiva	55
3.4.3. Parámetros poblacionales históricos: detección de	
mezcla genética intraespecífica	56
3.5. Discusión	59
3.5.1. Desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg	59
3.5.2. Estructura poblacional	59
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	75
Anexo I. Autorización para toma de muestras en Gallotia stehlini	
destinadas a uso científico	75
Anexo II. Median Joining Network (MJ) que representa	
las relaciones entre los distintos haplotipos mitocondriales	76
Anexo III. Minimum Spanning Network (MSN)	77
Anexo IV. Heterocigosidad observada (H_o), y heterocigosidad	
esperada (H _e), para cada locus por punto de muestreo	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de satélite del Archipiélago Canario (Google Earth)	8
Figura 2. Distribución de las erupciones holocénicas y sectores	
del NE de Gran Canaria	.11
Figura 3. Mapa geológico de Gran Canaria	.12
Figura 4. Paisajes de la Costa norte, Centro y Sur de la isla	
de Gran Canaria	.14
Figura 5. Individuo de G. stehlini alimentándose de brotes vegetales	.15
Figura 6. al Macho de G. stehlini, Caldera de Bandama (noreste de la isla)	
b/ Hembra de <i>G.stehlini</i> , Caldera de Bandama (noreste de la isla)	
c/ Macho de <i>G.stehlini</i> , Guía (norte de la isla)	
d/ Juvenil de <i>G.stehlini</i> , Mogán (suroeste de la isla)	.16
Figura 7. Comparativa entre un húmero de Gallotia galloti y otro de	
Gallotia goliath de yacimientos arqueológicos en la isla de Tenerife	.19
Figura 8. Esquema ADN mitocondrial	.22
Figura 9. Localización de los puntos de muestreo	.24
Figura 10. Mapa que representa las relaciones entre haplotipos	
resultantes de la MJ	.36
Figura 11. Mapa que indica la distribución de los clusteres de	
los haplotipos identificados por el Minimum Spanning Network	.38
Figura 12. Árbol consenso bayesiano en el que sólo los clados	
con una probabilidad del 95% HPD presentan la barra dibujada	.40
Figura 13. Cladograma con los tiempos medios de divergencia	
estimados al 95%HPD	.41
Figura 14. Mapa con la distribución geográfica de los resultados	
de la inferencia Bayesiana del ADN mitocondrial de G.stehlini	.43
Figura 15. Comparación entre las distribuciones de los linajes	
mitocondriales de G.stehlini , Tarentola boettgeri y Chalcides sexlineatus .	.46
Figura 16. Gráfico resultante de los análisis de ΔK	.57
Figura 17. Estructura genética poblacional, inferida para K=4	
y 4 loci de microsatélites	.57
Figura 18. Representación geográfica de los 4 clústeres	
nucleares obtenidos	.58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades, tamaños de muestra, y coordenadas	
geográficas de los 22 puntos de muestreo	24
Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados para la región	
citocromo b, designados por su extremo 3´ que corresponde a su	
posición en el genoma mitocondrial humano	27
Tabla 3. Datos máximos de LCC obtenidos en cada punto de muestreo	32
Tabla 4. Listado de haplotipos del ADN mitocondrial identificados	
en 90 individuos	34
Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación de microsatélites	
en G.stehlini	51
Tabla 6. Datos de los microsatélites amplificados en G.stehlini	54
Tabla 7. Loci alejados del equilibrio de Hardy-Weinberg por localidad	55
Tabla 8. Valores medios del índice de fijación F, de los índices	
estadísticos de F de Wright, y del número de migrantes efectivos,	
por loci y poblaciones	55

CAPÍTULO 1: Introducción general

"se encuentran lagartos grandes como un gato, pero no hacen ningún daño y no tienen ningún veneno". A.Cioranescu (ed.), Le Canarien.

1.1. Filogeografía: conceptos generales.

La filogeografía se puede definir como el campo de estudio que analiza los principios y los procesos que gobiernan las distribuciones geográficas de los linajes genéticos, especialmente aquellos a nivel intraespecífico (Avise, 1998). Dado que la filogeografía implica el estudio de los aspectos históricos (espaciales y temporales) de la actual distribución de los linajes genéticos, es considerada como una subdisciplina de la biogeografía. Integrando conceptos y técnicas de genética de poblaciones, genética molecular, sistemática filogenética, demografía, etología y paleontología.

La introducción de los análisis del ADN mitocondrial en la genética poblacional, a mediados de los años 70, produjo el avance tecnológico fundamental, para el nacimiento formal de la filogeografía como una disciplina. Haciéndose posible conectar los haplotipos de un modo filogenéticamente inteligible en un filograma, el cual se superpondría con la distribución geográfica del grupo en estudio (Avise, 2000).

Desde un punto de vista teórico, fue la teoría de la coalescencia la que aportó el marco conceptual necesario a la filogeografía, ya que básicamente esta teoría es un modelo de separación de linajes y deriva génica que se retrotrae en el tiempo, hasta un ancestro común (Harding, 1996). Apartándose de la teoría de la genética de poblaciones tradicional, al basarse en la teoría neutralista de la evolución molecular (Kimura y Ohta, 1969), la cual postula que la mayoría de las mutaciones que ocurren en las poblaciones son selectivamente neutras, con frecuencias fluctuantes, y que eventualmente pueden fijarse por deriva genética, es decir de forma aleatoria. De tal forma que todos los alelos de un gen en una generación derivan de, o coalescen hacia, un único alelo ancestral. Proporcionando además una explicación al concepto de reloj molecular, al ser capaces de estimar hace cuánto tiempo divergieron dos secuencias.

En términos analíticos, la filogeografía se concibe en dos áreas que difieren en la forma de análisis: la primera se basa en una idea gráficodescriptiva, donde las ramificaciones de un árbol se analizan bajo las hipótesis de la historia biogeográfica de los organismos, y que se sustenta en la reconstrucción filogenética de árboles de genes o redes de haplotipos, bajo

métodos filogenéticos o métodos de coalescencia. La segunda área, se centra en fundamentos estadísticos y matemáticos de demografía y estructura poblacional, basados en teoría de coalescencia, fenómenos estocásticos y estadística computacional, utilizando métodos basados en verosimilitud, particularmente de inferencia Bayesiana.

Las aplicaciones actuales de los análisis filogeográficos van desde la determinación de las vías de dispersión o de colonización de archipiélagos volcánicos (Cox *et al.*, 2010), hasta el estudio de los niveles de estructuración poblacional de una especie (Rodríguez *et al.*, 2014), o incluso estudios de filogeografía comparada (Losos, 2010) ya que si varias especies codistribuidas presentan patrones comunes, ello puede reflejar la influencia de factores evolutivos o ecológicos similares.

Así pues el enfoque filogeográfico establece un balance entre dispersión y vicarianza, para explicar las causas históricas de la distribución, permitiendo identificar factores, como por ejemplo extinciones y recolonizaciones o eventos de expansión del área geográfica, que también son determinantes fundamentales de la distribución.

1.2. Biotas insulares: importancia en los estudios sobre Evolución.

Las peculiaridades de las islas han despertado la imaginación de numerosos naturalistas desde tiempos inmemoriales. Ya el famoso geólogo Leopold von Buch en 1825, propuso la teoría de la especiación geográfica basándose en estudios de las Islas Canarias. Ese autor, defendía la idea del origen de las especies por separación geográfica. La cual, produciría el aislamiento para la reproducción, mecanismo necesario para la creación de nuevas variedades adaptadas a las nuevas condiciones. Originando especies distintas, que se alejarían cada vez más de su especie primitiva con el transcurso del tiempo.

Charles Darwin era seguidor de Von Buch y de hecho canceló un estudio geológico de las Canarias al surgirle el viaje en el HMS *Beagle* (1832-1837). En un principio también creía que el aislamiento era fundamental para la especiación, pero con los avances de sus estudios presentó otras soluciones.

En condiciones de simpatría, las barreras reproductivas surgirían por condiciones ambientales, o por caracteres conductuales. El aislamiento geográfico tendría su eficacia, pero disminuiría en poblaciones pequeñas debido al número menor de variaciones presentes.

En su expedición en el Beagle, aparte de sus apuntes como geólogo, recopiló informaciones como naturalista, convirtiendo a las islas Galápagos en el marco de su Teoría de la Evolución. Darwin, fue el primero en percatarse de las relaciones que existían entre la fauna y flora de las Galápagos con la de Sudamérica, dando ideas sobre los procesos de colonización. También identificó las distintas especies de tortugas terrestres de las Galápagos, como endemismos de cada una de las islas. Y con los especímenes que el colectó de diferentes aves: reyezuelos, sinsontes y pinzones, junto con la colaboración del ornitólogo John Gould que los examinó, propusieron las primeras explicaciones adaptativas a la diversidad de especies observadas.

En el caso específico de los pinzones, se percataron de que varios de ellos eran especies únicas de las Galápagos, que fenotípicamente eran bastante distintos unos de otros, pero que compartían algunos rasgos que evidenciaban que procedían de un ancestro común reciente. Con una gran diversidad en la forma de sus picos que fue el resultado de su adaptación a los distintos nichos ecológicos. Asumiendo que la migración entre las islas era muy rara, y que ello facilitaba la especiación alopátrica. Consecuentemente Darwin, cimentó la hipótesis de la selección natural y de la radiación adaptativa, que serían las bases de su posterior teoría de la evolución en "El origen de la especies" (1859). Sorprendentemente estudios filogenéticos más modernos han encontrado incongruencias entre las divergencias morfológicas y las divergencias genéticas de los pinzones de las islas Galápagos. El género con una sola especie basado en caracteres morfológicos, ha Certhidea demostrado tener dos especies distintivas genéticamente que además son las más distantes evolutivamente. Mientras que en el grupo de los pinzones arborícolas, las variaciones morfológicas son dramáticas, pero apenas hay diferenciación genética entre las especies. Una teoría es que la hibridación sea una de las causas que impida explicar estas relaciones evolutivas, provocando además una rápida respuesta ante las presiones de la selección natural. La divergencia entre las poblaciones aisladas de las distintas islas sería unos de

los primeros eslabones de la especiación, radiación adaptativa que seguiría siendo mantenida por la competición por los recursos tróficos en simpatría. Pero aún no se sabe del todo la secuencia exacta de estos fenómenos (Petren *et al.*, 2005; Farrington *et al.*, 2014).

Otro codescubridor de la selección natural fue Alfred Russel Wallace. Con su libro "Vida en las islas" (1880) clasificó las islas en Continentales y Oceánicas, estudiando las relaciones entre aislamiento, evolución y preservación. Postuló sus teorías, basado en el estudio del archipiélago malayo y Australia principalmente, en su obra "Darwinismo" (1889). Estableció el concepto de "línea divisoria de Wallace", para separar dentro de las islas malayas, las especies que tenían un origen asiático de las que tenían un origen australiano. Estudió el concepto de coloración aposemática y realizó diversos estudios biogeográficos, creando los fundamentos para las regiones zoogeográficas. Planteó que las islas dividían a las especies, es decir dividían a los ecosistemas, provocando la diversificación de las especies comunes, que quedarían separadas definitivamente bajo la presión de la selección natural, que contribuiría al aislamiento reproductivo de las especies por medio de mecanismos de aislamiento reproductivo o barreras a la hibridación (Efecto Wallace). Esta sería la gran diferencia con Darwin. Para Darwin, la adquisición de la esterilidad se debería a diferencias incidentales en el sistema reproductor de las especies progenitoras, ya que según él "La selección natural no podría provocar lo que no es bueno para el individuo". Según la visión de Wallace, la selección natural sí podría producir la esterilidad de especies cercanas, eliminando a la descendencia híbrida, y favoreciendo a aquellos organismos que se reprodujeran con su propia población.

Ya en el siglo XX, hay numerosos ejemplos de estudios centrados en islas: Ernst Mayr (1942) basó su obra "Sistemática y el Origen de las Especies" en las islas de Papúa Nueva Guinea. Aportando una síntesis a la teoría neodarwinista, combinando aspectos como exploración, descripción y capacidad de coordinación. Mayr considera dos formas de especiación: la instantánea, ej. poliploidía, partenogénesis; y la gradual, con la especiación simpátrica y la alopátrica solamente, destacando la importancia de los factores ecológicos.

Los estudios de MacArthur y Wilson (1967) con su Teoría sobre Biogeografía insular, en la que la ecología insular pasó de ser una ciencia

descriptiva a una ciencia predictiva. En la que proponen que el número de especies que habitan en una isla es constante, con un equilibrio entre colonización y extinción, y que estos procesos dependen del tamaño de la isla y de su aislamiento. La teoría de MacArthur y Wilson ha tenido una gran aplicabilidad en la Biología de la Conservación al haber servido para la definición del tamaño mínimo viable de una población (Gilpin y Soulé, 1986), y para el diseño de Áreas Naturales Protegidas.

En la región de estudio geográfico de este trabajo de tesis, la Macaronesia, los archipiélagos de Azores, Madeira, Salvajes, Canarias y Cabo Verde han sido objeto de numerosos estudios sobre biología evolutiva. Así por ejemplo, las relaciones filogeográficas de Lacerta dugesii, lacértido endémico de Madeira, han sido estudiadas, sugiriéndose que estas islas fueron colonizadas con bastante posterioridad a su emergencia, en comparación con las Islas Canarias, y probablemente debido a su aislamiento geográfico (Brehm et al., 2003). En Cabo Verde, los escíncidos Mabuya sp y Macroscincus sp han sido objeto de interés debido a su aparente gigantismo (gran tamaño corporal) y patrones de colonización (Carranza et al., 2001). En las Azores se ha intentado relacionar las bajas tasas de diversidad de los coleópteros, con los conceptos de especiación críptica y la reciente edad geológica del archipiélago (Amorim et al., 2012). En las Islas Canarias, se han estudiado con detalle las familias Lacertidae, Gekkonidae y Scincidae: Gallotia galloti (Brown et al., 2006); Gallotia atlantica (Bloor et al., 2008); Tarentola delalandii (Gübitz et al., 2000); Chalcides sexlineatus (Suarez et al., 2014), etc., entre otros.

En general, las principales ventajas que ofrece el estudio de las islas son: los niveles de migración entre distintas islas son bajos; hay una rápida propagación de la especie colonizadora a partir de un genotipo inicial homogéneo; y posiblemente la existencia de una variedad de nichos disponibles para la creación de una divergencia adaptativa.

Siendo además, los factores principales en la evolución de las especies isleñas: los cuellos de botella ("bottleneck") genéticos, especialmente al colonizar un área previamente vacía; la adaptación en aislamiento; la oportunista (que no perfecta) naturaleza de la selección natural, ya que las poblaciones responden a la selección en base a la variabilidad disponible en

ese momento y finalmente la historia ecológica de la especie, con sus patrones de colonización e interacciones (Berry, 1992).

No pudiendo haber dudas en la contribución que la biología de islas ha hecho en la comprensión de la evolución, y en las paradojas que ha suscitado: las islas son pobres en especies pero ricas en endemismos, y son aparentemente estables (con biotas de millones de años) pero muy vulnerables a variables externas como el impacto antropogénico, o especies introducidas (Cronk, 1997).

1.3. Gran Canaria: aspectos geológicos y ecológicos.

El Archipiélago Canario es uno de los mayores grupos de islas volcánicas en el Océano Atlántico, con un área de 7.447 km². Formado por siete islas, cuatro islotes y seis roques, entre los 27°38′- 29°25′de latitud y 13°20′-18°90′ de longitud. Posee un clima subtropical, con temperaturas cálidas y pocas fluctuaciones estacionales, aunque fuertemente influenciado por los húmedos vientos alisios del noreste. Dadas las direcciones de estos vientos y de las corrientes marinas, el norte de África y la Península Ibérica son las fuentes más probables de potenciales colonizadores.

El número de endemismos vegetales y faunísticos es muy elevado, y ha convertido al archipiélago en un centro de gran interés para los estudios sobre evolución y ecología. Así por ejemplo posee un total de 91 especies nativas de vertebrados, de las cuales 69 son aves, 13 son reptiles pertenecientes a los géneros *Gallotia*, *Chalcides* y *Tarentola* y 9 son mamíferos.

Gran Canaria (27°00′N, 15°35′O) es la isla central del Archipiélago, con una superficie de 1.560 km² distando 200 km de la costa oeste africana. Morfológicamente es un edificio cupuliforme, con una planta casi circular de 45 km de diámetro y un perfil transversal cónico con una altitud máxima de 1.949m. Está diseccionada radialmente por grandes cañones o barrancos, principalmente en su mitad suroeste.



Figura 1. Imagen de satélite del Archipiélago Canario (Google Earth).

Se pueden reconocer hasta cinco tipos distintos de pisos vegetales que proporcionan una diversidad potencial de nichos ecológicos para las distintas especies de la isla: un primer ecosistema de matorral árido subtropical (hasta los 250m de altitud). Por ejemplo, los matorrales costeros de cardonales-tabaibales. Con precipitaciones anuales inferiores a 250mm y grandes niveles de insolación. Un segundo ecosistema de matorral húmedo y bosque termófilo, desde los 250m hasta los 600m de altitud, con precipitaciones entre 350 y 600mm anuales y niveles buenos de insolación. Este piso también se denomina sabinar- palmeral, por ser abundante en estas dos especies.

En tercer lugar estarían los ecosistemas de bosques húmedos de laurisilva con plantas de la familia *Lauraceae*, entre los 600-1.000m de altitud, con una insolación reducida debida al "mar de nubes" producida por la condensación de la masa de aire de los vientos alisios, la cual aporta además una humedad adicional. Teniendo unas precipitaciones anuales entre 800 y 1.000mm. Entre este piso y el siguiente, habría un piso intermedio con comunidades de fayal-brezal.

En cuarto lugar los Pinares formados exclusivamente por *Pinus* canariensis, desde los 1.000m hasta los 2.000m de altitud y por último los

ecosistemas de matorral seco subalpino, alrededor de los 2.000m de altitud, representados por algún matorral de montaña en la isla, pero que no llega a constituir un piso vegetal en sí mismo. Hay que puntualizar, que actualmente las extensiones de los diversos ecosistemas de bosques se han visto muy disminuidas y fragmentadas en la isla de Gran Canaria, debido al impacto humano (Emerson, 2003).

Con lo que a modo de síntesis se puede decir que hay varios factores ambientales que contribuyen a las particularidades ecológicas de Gran Canaria: la influencia de las corrientes frías oceánicas; los vientos alisios; las distintas altitudes; el siroco ocasional, proveniente del Sáhara occidental; los vientos de gran elevación procedentes de latitudes tropicales; y una topografía diseccionada por volcanes, acantilados, cuevas, cañones profundos y barrancos. Todo ello origina distintas zonas climáticas, con unos rangos de temperaturas diurnas muy variables y de precipitaciones a medida que se sube en altitud.

La composición y edad de la parte submarina de la isla se desconoce, pero la parte sub-aérea data de unos 14.5 millones de años. Geológicamente, Gran Canaria se construyó fundamentalmente en tres fases magmáticas/ volcánicas:

El Ciclo I: Mioceno (14 a 8.5 Ma). Comenzó en la costa oeste de la isla, terminando con la formación del complejo Tejeda-Fataga, con una caldera de 15-20 Km de diámetro en el centro de la isla, la Caldera de Tejeda. La actividad volcánica estuvo prácticamente ausente de Gran Canaria entre los 8.5-5 Ma, y fue muy baja entre los 10-9 Ma y entre los 5-4 Ma. Durante estos intervalos, en el que probablemente la isla alcanzó más de 2.000 m de altitud, resultó fuertemente erosionada. Formándose un sistema radial de cañones o barrancos, que han perdurado hasta la actualidad, ocupando muchos las mismas posiciones que sus ancestrales barrancos de los campos de volcanes del Mioceno (Schmincke, 1968).

El **Ciclo II:** Plioceno inferior (5 a 3.4 Ma). Se corresponde con la formación del Roque Nublo, con un estratocono que llegó a medir 2.500 m de altitud (Anguita *et al.*, 1991). Posteriormente el sector norte y el sector sur de este edificio volcánico sufrió un colapso gravitacional, seguido de una gran avalancha de depósitos (3-4 km³) que se desplazó hacia el SO, después hacia

el S, y finalmente hacia el SE. Canalizándose principalmente por los Barrancos de Arguineguín, Fataga y Mogán, con una velocidad media de avance de 100 m/s. Cubriendo un área de unos 180 km². Siendo la dirección NO-SE uno de los alineamientos volcanotectónicos más importante de la isla y del archipiélago, junto con el alineamiento E-O.

Las avalanchas de lavas y sedimentos que invadieron el mar se extendieron 30-60 km, quedando superpuestas posteriormente por las avalanchas de Tenerife en el canal que hay entre estas dos islas. Mientras que entre Gran Canaria y Fuerteventura en el este, se formó una barrera topográfica submarina (Schmincke y Sumita, 1998).

El **Ciclo III:** Plio-Cuaternario (3.1 Ma hasta la actualidad). Está caracterizado por pequeñas erupciones en el centro y mitad noreste de la isla (García Cacho *et al.*, 1994). Apareciendo nuevas formaciones volcánicas como: la Caldera de Bandama. Durante este periodo post-Roque Nublo se desarrolló una cadena o "rift" volcánico de 2 km de ancho y 12 km de largo, activo entre los 3.5 y 1.9 Ma, que formó una ancha banda en sentido NO-SE cruzando la parte superior de la isla, coincidiendo con el contacto entre el viejo suroeste y el joven noreste (Guillou *et al.*, 2004).

También es importante hablar del crecimiento del grupo volcánico de La Isleta, ya que propició la división en dos sectores (según las localizaciones de las avalanchas), del NE de Gran Canaria. Sectores delimitados por una cresta NE-SO, que uniría la península de la Isleta con el centro de Gran Canaria.



Figura 2. Distribución de las erupciones holocénicas y sectores del NE de Gran Canaria (Rodríguez-González *et al.*, 2009).

Hoy en día, vestigios de las avalanchas del Roque Nublo se encuentran en cinco áreas principales de la isla: el sector sur-suroeste, cubriendo un área de unos 30 km²; sector central de la isla incluyendo el monolito del Roque Nublo (13 km²); costa noroeste; costa noreste (entre la Caldera de Bandama y Jinámar) y finalmente en el oeste, Mesa del Junquillo (Mehl y Schmincke, 1999). Igualmente se puede hablar de cuatro afloramientos de basaltos de volcanes tipo escudo del Mioceno, cuya distribución se basa en estudios geológicos de la isla. Las localizaciones de Güigüi-Horgazales, Agüimes y Agaete, estarían bien apoyadas en datos de campo, mientras que la localización de Arucas es una conjetura (Schmincke y Sumita, 1998) que aún a fecha actual no ha sido confirmada.



Figura 3. Mapa geológico de Gran Canaria (modificado de Rodríguez-González *et al.*, 2009).

Durante la evolución de Gran Canaria se pueden reconocer tres grandes cambios climáticos, basándose en el estudio de los sedimentos marinos y en las evidencias de fósiles terrestres. Desde finales del Mioceno hasta mediados del Plioceno, se puede hablar de la existencia de un clima semejante al clima ecuatorial actual, en la zona de Canarias. Contrastado con la fauna presente en los depósitos mio-pliocenos de las tres islas occidentales mayores. Sería un clima muy cálido, sin estacionalidad, con constantes lluvias, y con huracanes o ciclones periódicamente. Los cuales podrían causar potentes avalanchas en la isla de Gran Canaria debido al relieve propicio y la presencia de materiales frágiles (Meco, 2008). Este período de un clima ecuatorial sin estaciones, se vería continuado por un clima árido y desértico en Euráfrica, a partir de unos 4.6 Ma (Ravelo et al., 2004), con el comienzo de un rápido ascenso del nivel del mar, causada por la fusión de hielos en latitudes más altas (Meco, 2008). Mostrando oscilaciones entre aridez y humedad que continuaron sucediendo hasta el Plio-Cuaternario, en el que hace unos 2.7 Ma ya se definiría una estacionalidad con inviernos muy húmedos continuados y veranos cálidos (Haug et al., 2005).

Desde una perspectiva ecológica, las erupciones volcánicas producen nuevos hábitats estériles que cambian muy rápidamente, debido a que el estrato físico es muy inestable, con lo que la erosión actúa rápidamente, y están sujetos a las sucesiones primarias. Los primeros colonizadores suelen ser los animales aéreos, pero las especies terrestres pueden colonizar desde sustratos más antiguos adyacentes.

Las Islas Canarias son un buen ejemplo para el estudio de las relaciones entre los procesos de colonización y de sucesión en las comunidades animales (Ashmole *et al.*, 1992). En las isla de Gran Canaria, por ejemplo, las violentas erupciones que formaron el complejo del Roque Nublo fueron muy explosivas, y seguramente provocaron una masiva extinción de especies en la isla, sobreviviendo únicamente aquellas limitadas a los ambientes costeros (Marrero y Ortega., 2001), con lo que los ecosistemas boscosos de altitudes superiores fueron recolonizados y estarían datados con posterioridad al período eruptivo del Roque Nublo. Prediciéndose que la biodiversidad en Gran Canaria, medida como diversidad genética, sería inferior en los ecosistemas de bosques de laurisilva, y pinares, que en los demás ecosistemas presentes en la isla (Emerson, 2003).

1.4. Gallotia stehlini (Schenkel, 1901): descripción de la especie.

Lagarto Canarión, Lagarto Gigante de Gran Canaria.

Conocido vulgarmente como Lagarto Canarión o Lagarto Gigante de Gran Canaria, es un lacértido endémico de la isla de Gran Canaria, asignado taxonómicamente a la familia Lacertidae, y subfamilia Gallotiinae, con una amplia distribución desde el nivel del mar, habitando los cardonales-tabaibales, y malpaíses, hasta altitudes superiores a los 1.500 m. Pero con unas densidades muy bajas en los restos de pinares, laurisilva o faya-brezal que aún quedan en la isla.



Figura 4. Paisajes de la Costa norte, Centro y Sur de la isla de Gran Canaria (Irma Herrera Bravo de Laguna).

El Lagarto de Gran Canaria presenta un aspecto robusto, pudiendo alcanzar tamaños superiores a los 280 mm de longitud cabeza- cuerpo y pesos que sobrepasan los 950 g. Sin embargo desde la llegada del hombre al archipiélago el tamaño máximo de estos individuos ha disminuido, y raramente alcanzan los 140 mm de longitud cabeza-cuerpo. Se han encontrado evidencias del consumo de *Gallotia stehlini* por parte de la población aborigen en diversos yacimientos arqueológicos, aunque no parece responder a una estrategia dirigida, sino al aprovechamiento oportunista de un recurso alimenticio disponible en el medio (Martín *et al.*, 1999).Con lo que aunque *G.stehlini* no es una especie en peligro de extinción, sí que ha habido una compresión en su estructura de edad-clase debido a factores antrópicos.

Son animales omnívoros, aunque su dentición al presentar cada diente tres o más cúspides, junto con la presencia de un ciego intestinal, acompañado de una helmintofauna parásita asociada capaz de digerir la celulosa, podría indicar una cierta tendencia vegetariana (Carretero *et al.*, 2006), que no es tan evidente en especie más pequeñas como *G.atlantica*, que aunque omnívora es básicamente insectívora, o *G.galloti* que sería fundamentalmente frugívora.



Figura 5. Individuo de *G.stehlini* alimentándose de brotes vegetales (Irma Herrera Bravo de Laguna).

Alcanzan la madurez sexual, en el cuarto o quinto año de vida (Castanet y Báez, 1991), poniendo las hembras una media de entre 6-14 huevos entre los meses de mayo y julio (Bannert, 1998). Los recién nacidos tienen un tamaño de unos 40 mm de longitud cabeza-cuerpo, y un diseño dorsal marcado que se pierde con la edad (Castanet y Baéz, 1991).

Los adultos muestran un dorso pardo grisáceo, a veces con bandas transversales claras de borde oscuro, con ocelos claros redondeados en los costados; aunque en los machos adultos más viejos el dorso es negruzco. La región gular es anaranjada, a menudo con dos bandas oscuras a cada lado que convergen en la unión de las submaxilares. Siendo éste un carácter de dimorfismo sexual, ya que los machos presentan la coloración anaranjada de la garganta más conspicua, junto con un mayor tamaño corporal, y una cabeza de un mayor tamaño relativo (Bannert, 1998). Es una especie diurna (Bannert, 1998), y se ha comprobado que las hembras son más activas en primavera, que en verano y otoño (Vernet *et al.*, 1995).



Figura 6. a/ Macho de *G.stehlini, Caldera de Bandama* (noreste de la isla). b/ Hembra de *G.stehlini*, Caldera de Bandama (noreste de la isla). c/ Macho de *G.stehlini*, Guía (norte de la isla). d/ Juvenil de *G.stehlini*, Mogán (suroeste de la isla). (Irma Herrera Bravo de Laguna)

Morfológicamente, esta especie es poco variable a lo largo de la isla, aunque algunos caracteres folidóticos sí sufren pequeñas variaciones geográficas y altitudinales, pero no hasta el punto de poderse describir nuevas subespecies (Thorpe y Baez, 1993). A diferencia del escíncido *Chalcides sexlineatus*, también endémico de Gran Canaria, que presenta variaciones geográficas en diversos caracteres morfológicos como respuesta a procesos de selección natural ante los cambios de vegetación y clima dentro de la isla (Brown *et al.*, 1991). Lo cual fue confirmado posteriormente mediante estudios de su ADN mitocondrial y microsatélites, bajo una alternativa perspectiva histórica vicariante (Suarez *et al.*, 2014). Con lo cual, en Gran Canaria la variación morfológica de *C.sexlineatus* parece ser una consecuencia de selección natural más que un efecto producido por deriva genética durante un periodo de antigua vicarianza relacionado con las erupciones volcánicas que ocurrieron hace 1.5-3.0 Ma.

Diversos estudios acerca de la naturaleza de las variaciones geográficas filogenéticas y ecogenéticas han propuesto que el nivel de congruencia entre los caracteres debidos a estas últimas es inferior al provocado por las

variaciones geográficas debidas a motivos filogenéticos. Esto se debe a que bajo un acontecimiento filogenético, como es la vicarianza o la dispersión, todas las características son influenciadas por el mismo suceso, mientras que con la ecogénesis diferentes caracteres pueden responder a diferentes fuerzas selectivas. Por ejemplo en *G.stehlini* las escamas del collar muestran una variación latitudinal, los poros femorales femeninos presentan una variación altitudinal, y las escamas de los dedos variaciones longitudinales (Thorpe y Báez, 1993).

El género *Gallotia* se define como una unidad monofilética (Arnold, 1973), confirmándose a nivel molecular, con el estudio de fragmentos de ARN ribosómico 12S y de citocromo b (González *et al.*, 1996). Siendo el género *Psammodromus el* taxón *más cercano a Gallotia* sp, tanto a nivel morfológico, con similitudes en sus esqueletos y hemipenes (Arnold, 1973) como a nivel molecular (Harris *et al.*, 1998). Especulándose el origen de *Gallotia* en las islas Canarias, a partir de una especie ancestral que vivió en el suroeste de Europa o en el noroeste de África a finales del oligoceno. Una época de grandes cambios climáticos que ocasionó la desaparición de las especies mayores y más especializadas, mientras que las más generalistas experimentaron una gran radiación (Busack y Maxson, 1987).

Se sugiere que los acontecimientos cladogénicos que originaron a *Gallotia stehlini* y a *Gallotia atlantica* (especie presente en Lanzarote-Fuerteventura e islotes orientales), fueron muy cercanos en el tiempo, correspondiéndose este nodo ancestral con el final del Mioceno: *G.stehlini* constituiría el nodo más basal del género *Gallotia*, mientras que *G.atlantica* pertenecería al siguiente nodo (Cox *et al.*, 2010). La radiación de *Gallotia* por todo el archipiélago se supone que siguió un patrón geográfico desde las islas más orientales hacia las occidentales, siendo *G.stehlini* la especie más divergente de todas. Morfológicamente *G.stehlini* sería la más similar a *G.simonyi* (endémica de El Hierro) sobre todo en tamaño corporal, pero molecularmente *G.simonyi* sería más próxima a *G.galloti* (islas occidentales). Así Lanzarote y Fuerteventura habrían sido las primeras islas colonizadas hace unos 17-20 Ma, a partir de las cuales se habría colonizado Gran Canaria alrededor de unos 12 Ma. Las demás islas occidentales, como La Gomera y Roque del Conde (una de las tres islas primitivas que formarían Tenerife)

serían colonizadas a partir de un ancestro común procedente de Lanzarote o de Fuerteventura hace unos 9-10 Ma. Formas iniciales que por procesos de especiación en alopatría originarían las dos nuevas especies: *galloti* y *simonyi* (Rando *et al.*, 1997). Ambos clados, tanto el perteneciente a los tamaños corporales grandes (*simonyi*, *gomerana* e *intermedia*), como el constituido por las especies con tamaños corporales pequeños (*galloti* y *caesaris*) evolucionaron simultáneamente en torno a unos 5-6 Ma. Dispersándose y colonizando La Gomera desde estas islas tinerfeñas ancestrales hace unos 3 Ma (aunque no se pueda confirmar el sentido de la dispersión), La Palma desde Tenerife hace unos 1.77 Ma, y El Hierro desde La Gomera hace 1.12 Ma (Cox *et al.*, 2010).

Gallotia stehlini ha sido el único lacértido natural descrito en la isla de Gran Canaria hasta el momento, a diferencia de las demás islas occidentales del archipiélago en las que hasta dos especies del género *Gallotia* han sido simpátricas: siempre una especie de gran tamaño junto a otra de pequeño tamaño. Las prospecciones paleontológicas en las islas han sido muy esporádicas y superficiales, en parte debido a las dificultades ocasionadas por su naturaleza volcánica para el hallazgo de fósiles bien conservados, no obstante en Gran Canaria nunca se han encontrado fósiles pertenecientes al grupo de especies pequeñas. Con lo que, aunque se supone que el grupo de estas especies menores colonizaron las islas en una segunda oleada, desplazando competitivamente a las formas mayores, causándoles la extinción, en Gran Canaria simplemente ocurrió lo contrario: la especie de mayor tamaño sobrevivió a la de menor tamaño (Machado, 1985).

En los años 80 es cuando se ha observado la introducción de *Gallotia atlantica* (especie de menor tamaño) en la montaña de Arinaga en Gran Canaria (Barquin y Martín, 1982), pero no hay constancia de que haya podido propagarse por otras localidades de la isla. Estudios moleculares han constatado que se trataría de especímenes de *G.atlantica* procedentes de la isla de Lanzarote, y no de Fuerteventura, como cabría suponer al estar más próxima geográficamente. Y así mismo, se ha citado la introducción de *G.stehlini* en dos localidades de Fuerteventura: Puerto del Rosario y Ladera norte del barranco de la Torre, pero serían introducciones recientes de este siglo (Naranjo *et al.*, 1991; González *et al.*, 1996).



Figura 7. Comparativa entre un húmero de *Gallotia galloti* y otro de *Gallotia goliath* de yacimientos arqueológicos en la isla de Tenerife (Morales *et al.*, 2009).

En el Libro Rojo de Vertebrados Españoles *G.stehlini* aparece como especie no amenazada, y a nivel mundial como especie bajo preocupación menor por la UICN. Factores de amenaza tradicionales han sido las alteraciones del hábitat, trampeo, uso de biocidas, coleccionismo y comercio (Machado *et al.*, 1985). Entre sus depredadores naturales se encuentran el cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), y el alcaudón (*Lanius meridionalis*) entre otros, mientras que de las especies introducidas hay que destacar a la serpiente Rey de California (*Lampropeltis getula californiae*) que se ha introducido en Gran Canaria en los municipios de Telde, Valsequillo y Gáldar.

1.5. Objetivos.

Estudio de la variación geográfica del Lagarto Canarión, *Gallotia stehlini*, en la isla de Gran Canaria, desde un punto de vista genético.

Trabajos recientes, han demostrado la variación genética de los lagartos dentro de pequeñas islas, en los archipiélagos del Caribe y de Macaronesia. En el archipiélago Canario, está constatada la importancia que las erupciones volcánicas y los procesos ecológicos han ejercido en este proceso evolutivo, provocando varios efectos genéticos a través del aislamiento y extinción de poblaciones locales. Esto ha hecho que las Islas Canarias se hayan convertido

en un modelo de "laboratorio viviente" para biólogos evolucionistas, centrándose en el estudio de la colonización de las islas y posterior evolución de las especies endémicas de este archipiélago.

En este estudio se han utilizado técnicas de amplificación de zonas concretas del ADN mitocondrial, y marcadores nucleares como los microsatélites, para evaluar los efectos de los procesos históricos y actuales sobre la diversidad genética de *Gallotia stehlini*, el cual es una especie monotípica, para la que sólo se han descrito ligerísimas variaciones en algunos caracteres folidóticos relacionadas con factores como la altitud o la vertiente.

Los objetivos del proyecto de tesis son:

1. Cuantificación de la diversidad genética de *Gallotia stehlini* en Gran Canaria, mediante el uso de diversos marcadores moleculares: ADN mitocondrial, y ADN nuclear.

El uso exclusivo del ADN mitocondrial, puede ser limitado, ya que al implicar un único locus, puede que no se refleje adecuadamente la historia poblacional de la especie, al poder estar ligado a selección, presentar introgresión, o al no identificarse su dispersión entre poblaciones, como consecuencia de las diferencias etológicas o ecológicas entre hembras y machos (Avise, 2009).

2. Análisis del componente espacial de dicha variación, comparándolo con la evolución morfológica de la misma especie.

 Evaluación de varias hipótesis explicativas de las causas de la diversidad observada, y comparación con la microevolución de otras especies de reptiles.

Con lo cual se evalúa la existencia de patrones filogeográficos concordantes (Avise, 2009) dentro de la isla de Gran Canaria y patrones parecidos en el archipiélago Canario como en otras partes del mundo.

CAPÍTULO 2: ADN MITOCONDRIAL

2.1. Introducción.

El ADN mitocondrial posee todas las ventajas deseadas en cualquier marcador molecular: es uniforme en su contenido genético, ya que tanto en animales multicelulares como en protozoos tiene una estructura genética sencilla compuesta de 37 genes (De la Cruz *et al.*, 1984). Se distribuye universalmente en el reino animal; es fácil de aislar debido a que está dentro de un orgánulo y posee un gran número de copias. Las propiedades moleculares del ADN mitocondrial son: es una molécula bicatenaria, circular, cerrada, de 16-20 kilobases de longitud. Con 13 subunidades polipéptidas esenciales para los procesos de fosforilación oxidativa, 2 ARN ribosómicos, 22 ARN de transferencia, y un área conocida como región control o "D-loop" (en vertebrados y equinodermos), de unos 0.8 kilobases de longitud que controla la replicación del ADN mitocondrial y la transcripción de los ARN. A diferencia del ADN nuclear no tiene intrones ni secuencias repetitivas.



Figura 8. Esquema ADN mitocondrial.

Posee un modo de transmisión genética directa, generalmente estrictamente materna, aunque hay reportados ejemplos de heteroplasmia debido a mutaciones o contribuciones paternas (Breton *et al.*, 2007). No sufre procesos de recombinación, y presenta una alta tasa de evolución. Esta evolución al nivel de las secuencias de nucleótidos es rápida, siendo la mayoría

de los cambios genéticos simples substituciones de bases; algunas son pequeñas inserciones o deleciones, aunque algunas pueden implicar hasta cientos de nucleótidos. Estas diferencias de tamaños suelen estar relacionadas con la región control de la molécula, que en general evoluciona muy rápido (Avise *et al.*, 1987), y se deberían a aparentes fallos en los mecanismos de replicación del ADN y posteriores reparaciones. Consecuentemente la tasa efectiva de mutación es superior para el ADN mitocondrial que para el ADN nuclear, haciéndolo especialmente idóneo para el estudio de estructuras poblacionales a nivel intraespecífico, al ser más sensible en la detección de cuellos de botella y subdivisiones poblacionales que el ADN nuclear (Wilson *et al.*, 1985).

Las células somáticas típicas poseen cientos a miles de mitocondrias, cada una con varias copias de ADN mitocondrial, sin embargo, en general existe un haplotipo mitocondrial preponderante por cada individuo. Esta característica denominada homoplasmia, resulta fundamental para poder realizar un análisis filogeográfico, donde las unidades de estudio son los individuos. Así mismo su tipo de herencia, junto con la ausencia de procesos de recombinación, permite describir la historia matrilineal de organismos conespecíficos y con ello el poder aplicar estimaciones de reloj molecular y realizar análisis coalescentes.

2.2. Material y métodos.

2.2.1. Trabajo de campo.

Campaña realizada entre abril y septiembre del 2000 con los permisos pertinentes solicitados al Cabildo de Gran Canaria, Servicio de Medio Ambiente (Anexo I).

Los ejemplares de *Gallotia stehlini* (N=466) fueron trampeados utilizando trampas tipo "pit-fall", enterradas a ras de suelo, en 22 puntos distribuidos independientemente y cubriendo toda la superficie de la isla de Gran Canaria. Se intentó obtener 20 individuos por punto o población muestreada, pero

debido a las bajas densidades de *G.stehlini* en los ecosistemas de pinares y laurisilva, el número de muestra aquí varió entre 2 y 5 individuos.



Figura 9. Localización de los puntos de muestreo.

Punto	Localidad	Ν	Latitud	Longitud
A=1	Mogán	20	27°52′31.34′′N	15°43′48.22′′O
B=2	Guía	21	28°8′22.46′′N	15°36′6.69′′O
C=3	Arucas	20	28°8′3.19′′N	15°31′5.64′′O
D=4	La Atalaya de Sta. Brígida	21	28°1′57.00′′N	15°27′18.00′′O
E=5	San Mateo	20	28°0′29.34′′N	15°31′52.68′′O
F=6	Tejeda	20	28°0′17.71′′N	15°36′0.11′′O
G=7	Teror	23	28°3′45.84′′N	15°32´0.60´´O
H=8	San Isidro	21	28°1′51.66′′N	15°33′41.84′′O
I=9	Gáldar	27	28°9′24.17′′N	15°39′23.11′′O
J=10	Agaete	24	28°5′49.59′′N	15°41′59.93′′O
K=11	Artenara	20	28°1′41.15′′N	15°41′59.68′′O
L=12	Tamadaba	2	28°2′43.53′′N	15°44′48.67′′O
M=13	Barranco del Laurel	3	28°4′20.73′′N	15°36′42.33′′O
N=14	Tasartico	24	27°55′6.88′′N	15°48′39.94′′O
0=15	Embalse Caidero de la Niña	26	27°58′53.08′′N	15°43′49.26′′O
P=16	Telde	24	27°59′35.81′′N	15°23′43.90′′O
Q=17	Barranco de Guayadeque	33	27°56′48.83′′N	15°32′0.79′′O
R=18	Barranco de Tirajana	37	27°54′25.76′′N	15°33′47.95′′O
S=19	Arinaga	22	27°51′42.46′′N	15°24′8.91′′O
T=20	Arguineguín	28	27°48′36.93′′N	15°39′56.71′′O
U=21	Fataga	25	27°48′42.03′′N	15°34′41.19′′O
V=22	Ayacata	5	27°58′12.74′′N	15°36′45.17′′O

Tabla 1. Localidades, tamaños de muestra, y coordenadas geográficas de los22 puntos de muestreo.

Se utilizaron métodos no invasivos para la obtención de las muestras de ADN, mediante la amputación de la punta de la cola. Siendo éste un método estándar, y muy utilizado, incluso para especies en peligro de extinción al no suponer ningún daño para los individuos, puesto que la autotomía de las colas es algo muy común en los lagartos, llegando a frecuencias del 80% en algunas poblaciones naturales (Van Sluys *et al.*, 2002). Las muestras fueron conservadas en etanol al 90%, y ninguno de los animales fue extraído de su punto de muestreo.

Los datos recopilados para este tipo de estudios pueden ser morfológicos y moleculares. Pero mientras los primeros reflejan cambios en el fenotipo, ej. genotipo-ambiente, los datos moleculares reflejan únicamente cambios genotípicos, con la peculiaridad de que una gran proporción de los cambios moleculares son fenotípicamente neutros y no son reflejados en los estudios puramente morfológicos. La selección Natural predice la adaptación de la especie a su ambiente, pero la habilidad de respuesta ante el cambio de estas condiciones, reside en la variabilidad del reservorio genético de las distintas poblaciones de la especie. Con lo cual, el componente genético es crítico.

Se anotaron los tamaños corporales de los individuos en el campo: LCC (longitud cabeza-cola), LC (longitud cola), LP (longitud píleo), AP (anchura píleo) y la distribución sexual de los individuos.

2.2.2. Aislamiento del ADN genómico.

En el estudio a nivel mitocondrial se aisló al ADN de 405 ejemplares: 20 ejemplares de 20 de los puntos de muestreo, más dos y tres ejemplares de los dos puntos restantes incompletos. Realizándose la extracción del ADN con el producto *PUREGENE*® Genomic DNA Isolation Kit de Gentra Systems.

Siguiendo las pautas del protocolo, se colocaron 5 mm (5-10 mg) de cola fresca, previamente triturada en un eppendorf de 1.5 ml conteniendo 300 µl de solución de lisis (Cell Lysis Solution). Se añadió 4 µl de proteinasa K (Proteinase K Solution) (20 mg / ml) a la cola triturada y se mezcló mediante vórtex. Incubándose a 55°C durante toda la noche o hasta que el tejido se

hubiera disuelto, con lo que normalmente estuvieron incubándose una media de dos días.

Tras este primer paso de lisis celular, se procedió a la precipitación de las proteínas, para ello se enfriaron las muestras a temperatura ambiente, y se centrifugó y cogió el sobrenadante, para tener un ADN más limpio. Se añadió 100 µl de solución de precipitación de proteínas (Protein Precipitation Solution) al lisado celular y además 250 µl de cloroformo, para ayudar a la separación de las proteínas. A continuación se aplicó un vórtex a alta velocidad, durante 20 segundos, para mezclar bien dicha solución con la muestra. Se incubó en hielo durante 5 minutos y finalmente se centrifugó a 13000-16000 G durante 3 minutos. El precipitado resultante de proteínas, formó un pellet compacto o precipitado de proteínas.

Para la precipitación final del ADN se transfirió el sobrenadante (que contendría el ADN) a un nuevo eppendorf de 1.5 ml con 300 µl de isopropanol al 100%. Se mezcló la muestra invirtiéndola unas 50 veces y se centrifugó a 13000-16000 G durante 2 minutos; el ADN se visualizó como un pequeño pellet blanco. Se desechó el sobrenadante y se añadió 300 µl de etanol al 80%, invirtiéndose el tubo para lavar el pellet de ADN. Se centrifugó a 13000-16000 G durante 2 minutos, y se retiró el etanol. Se dejó secar el resto de alcohol que no se pudo retirar, a 37°C durante 10-15 minutos. Tras ello, se añadió 50 µl de solución de hidratación (DNA Hydratation Solution), y se incubó la muestra a 37°C durante 1 hora, o a temperatura ambiente durante toda la noche. Las concentraciones de ADN así obtenidas fueron valoradas mediante el espectrofotómetro, y las muestras aisladas fueron conservadas a –20°C.

2.2.3. Amplificación.

Se seleccionaron en un principio varias regiones mitocondriales para ser amplificadas, de las cuales finalmente se trabajó con el citocromo b, debido a su alta tasa de sustitución. Se seleccionaron 5 muestras de los ADN aislados con las mejores concentraciones y grados de pureza de cada uno de los puntos de muestreo, a excepción de los dos puntos en los que únicamente se contaba con 2 y 3 muestras. Eso dio un total de 105 muestras para amplificar. Para ello se utilizó el primer L14841 (Fu, 2000) para la cadena ligera, y el primer
Gat_H15915, un primer modificado del primer H15915 original de Fu (Paul Bloor, comunicación personal), para la cadena pesada.

Primer Secuencia primer sentido 5'-3'		Referencia	
Gat_H15915	5′ GTC CTC ATC TTT GGT TTA CAA GAC 3′	Este estudio	
L14841	5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3'	Fu, 2000.	

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados para la región citocromo b, designados por su extremo 3' que corresponde a su posición en el genoma mitocondrial humano (Anderson *et al.*, 1981).

Las condiciones de amplificación utilizadas para la técnica de PCR fueron las siguientes: la reacción se realizó en un volumen de 30 μ l utilizando 2ng de ADN genómico, 2.0 mM de cloruro de magnesio, 0.2 mM de cada nucleótido, 1X de tampón de PCR (Bioline, 16mM (NH₄) SO₄, 67mM Tris-HCL pH 8.8, 0.01% Tween-20), 0.2 unidades de Taq Polimerasa (Roche), y 0.4 μ M de cada primer.

Se aplicaron 35 ciclos en una PCR Eppendorf Mastercycler Gradient con los siguientes pasos : tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, se programaron 35 ciclos a 94°C (30 segundos), una temperatura de anillamiento de 55°C (30 segundos), y 72°C (30 segundos) , con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos así amplificados fueron chequeados en geles de agarosa al 2%, obteniéndose bandas únicas y limpias (sin "smears") en torno a los 1200 pb. Estos productos amplificados de PCR se purificaron antes de realizarse las reacciones de secuenciación mediante columnas (MicrospinTM S-400 HR Columns) de Amersham Biosciences.

2.2.4. Secuenciación.

Para la secuenciación de las muestras amplificadas, se siguió el protocolo pautado para la secuenciación con el kit de dRhodamina Terminator v 3.1 en el secuenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems. El cual proporciona todos los reactivos necesarios para la reacción

de secuenciación. Así pues para un volumen total de 5 μ l se añadieron: 0,5 μ l de solución 1, 1,5 μ l de solución 2, 8ng del ADN amplificado y purificado, 5pmoles de primer y agua bidestilada hasta completar el volumen final de la reacción. Llevándose al termociclador con las siguientes condiciones: 94°C (2 minutos), 55°C (30 segundos), 72°C (30 segundos), 72°C (10 minutos).

A continuación se precipitaron las muestras, colocándolas en un Eppendorf de 1,5 ml con 16 µl de etanol al 95%, 4 µl de agua bidestilada y 5 µl de muestra. Tras aplicarles un vórtex, estuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 minutos, tras lo que se retiró el sobrenadante y se añadieron 62,5µl de etanol al 70%. Volviendo a centrifugarse a máxima velocidad durante diez minutos, para retirar nuevamente el sobrenadante. Dejándose evaporar los restos de alcohol a temperatura ambiente unos 15minutos.

Por último, las muestras se resuspendieron en 10 µl de formamida en la gradilla del secuenciador, se pusieron en hielo (3 minutos), se desnaturalizaron a 95°C durante tres minutos más, y se colocaron en la placa del secuenciador automático.

2.2.5. Análisis de las secuencias de ADN.

Se obtuvieron secuencias de 1.200 pb de las que se removieron las regiones que contenían bases ambiguas (al comienzo y al final de las secuencias). Las secuencias fueron alineadas manualmente, corregidas y contrastadas las lecturas de las cadenas ligeras con las cadenas pesadas para cada muestra, mediante los programas BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, T.A. 1999) y Mega6 (Tamura *et al.,* 2013). Las secuencias para los análisis quedaron con una longitud de 1.027 pb, las cuales al ser alineadas y traducidas no presentaron codones de parada en lugares impropios, ni presencia de pseudogenes amplificados.

Los haplotipos fueron designados utilizando el programa TCS: Phylogenetic network estimation using statistical parsimony (Clement *et al.*, 2000). De las 105 secuencias originales se descartaron aquellas cuyas lecturas no pudieron ser confirmadas por ambos primers, siempre con una perspectiva

muy conservadora. Quedando entonces 90 secuencias para los análisis posteriores.

2.2.6. Reconstrucción filogenética.

Se utilizaron tres métodos diferentes para investigar las relaciones entre los haplotipos, y se compararon los resultados: una Median Joining network (MJ), con la aplicación del programa Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd. 2015); una Minimum spanning networks (MSN), por medio del programa HapStar (Teacher y Griffiths, 2011), y una inferencia Bayesiana (BEAUti-BEAST de Drummond *et al.*, 2012). En todos los casos se crearon redes en vez de árboles, para representar más claramente las relaciones entre los haplotipos, al no limitarse las conexiones al modo lineal, o bifurcado característico de los árboles (Posada y Crandall, 2001).

Una Median Joining network (MJ) comienza combinando los Minimum spanning trees en una sola red, añadiendo los vectores de conexión bajo un criterio de máxima parsimonia. Pero requiere la ausencia de recombinación, restringiéndose su uso al nivel poblacional. En los análisis se le dio el mismo peso a las transversiones que a las transiciones (1:1). Para épsilon, que es una medida del peso de la distancia genética, se eligió un valor de 0, ya que con valores en el rango de 0-5 no variaban los resultados, y con unos valores superiores se producía un colapso de los análisis que no superaban el 33 % de progreso. El cálculo de la distancia entre los vectores se realizó utilizando el criterio del coste de conexión ("connection cost").

Para el segundo método empleado, la creación de una Minimum spanning networks (MSN) se calcularon las distancias en Arlequín v.3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010), especificándose que en el análisis se incluyeran las posiciones perdidas ("missing sites"), con un nivel permitido máximo de pérdida por locus de 0.05. En HapStar se procesaron gráficamente los datos resultantes, conectándose todas las secuencias según el algoritmo de Prim (1957), sin la producción de bucles.

Ambos métodos, basados en el concepto de máxima parsimonia han sido los más usados tradicionalmente debido a su simplicidad, no obstante no permiten la asignación de probabilidades a las incertidumbres asociadas con la

reconstrucción de localidades ancestrales. Así mismo, al nivel intraespecífico, las relaciones entre los genes no son jerárquicas, al ser el resultado de una reproducción sexual y procesos de mutación. Muestran una divergencia conespecífica más lenta que en los individuos de distintas especies y esto limita el uso de sus caracteres para análisis filogenéticos (Posada y Crandall., 2001), disminuyendo la resolución de los métodos tradicionales: máxima probabilidad, máxima parsimonia... a favor de nuevas tendencias como el uso de redes en vez de árboles, y métodos de inferencia Bayesiana. De ahí que sea conveniente el uso de un modelo basado en una aproximación Bayesiana. De este modo, la inferencia Bayesiana de la filogenia permitió elucidar las incertidumbres con las relaciones entre los haplotipos y estimar los tiempos de divergencia simultáneamente. La inferencia Bayesiana, se distingue de otros métodos de inferencia, en que lo que se obtiene tras el análisis es una distribución de probabilidades, en las que se caracterizan sus distribuciones posteriores mediante el algoritmo de Monte Carlo (MCMC).

Se evaluó cuál sería el mejor modelo de sustitución nucleotídica para las secuencias del estudio, mediante el programa jModelTest (Darriba *et al.*, 2012). Para ello, las secuencias fueron partidas según sus posiciones (1+2) y (3) en el codón (Bofkin y Goldman, 2007). Se estudiaron las probabilidades para un total de 88 modelos, bajo un criterio bayesiano (BIC) para las comparaciones, y con tasas de variación para I y G. Se seleccionó BIC debido a que penaliza el uso excesivo de parámetros, con lo cual siempre elegirá aquellos modelos más simples, con un error absoluto y relativo menor, y consecuentemente con una mejor habilidad predictiva (Sullivan y Joyce, 2005).

Para la estimación de los tiempos de divergencia, se utilizó un prior sobre los tiempos especificado por un modelo de Nacimiento-muerte ("Birth-death model"). Se añadieron secuencias homólogas, adquiridas de GenBank de *G.galloti, G.galloti palmae, G.caesaris caesaris, G.caesaris gomerae* y *G.atlantica* para una mejor caracterización de los puntos de calibración. Los tiempos de divergencia fueron calculados calibrando los nodos a priori según Cox *et al.*, (2010), teniendo en cuenta la edad geológica de cada una de las islas, para la datación de las distintas colonizaciones por parte de *Gallotia* sp. De tal modo que el nodo más basal correspondiente a la divergencia de *G.stehlini* del resto de los representantes del género, fue calibrado con un límite

superior de 13.4 Ma. El siguiente nodo *G.galloti- G.galloti palmae* fue calibrado mediante una distribución uniforme con un límite superior de 1.77 Ma, y el nodo *G.caesaris gomerae- G.caesaris caesaris* fue calibrado con una distribución uniforme, pero con un límite superior de 1.12 Ma.

Se añadió un árbol inicial de comienzo, como referencia para la ejecución de los análisis. Los análisis se repitieron para 50 millones de generaciones, muestreando la cadena cada 5.000 generaciones. A continuación tras comprobar con el programa Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) que se había alcanzado la convergencia, y que el grado de confidencia de las estimaciones era aceptable, se utilizó el programa TreeAnnotator y FigTree (Morariu *et al.*, 2008) para recopilar la información de los árboles obtenidos y obtener el árbol consenso de los resultados de los análisis.

2.3. Resultados.

2.3.1. Datos morfológicos.

De los animales trampeados, en casi todos los puntos muestreados se encontró individuos que superaron los 140 mm de LCC, a excepción de en tres localidades: Tamadaba, Barranco del Laurel, y Ayacata. No se tienen datos de Mogán. En La Atalaya de Sta. Brígida y en Teror, sucedió todo lo contrario, la proporción de individuos con tallas grandes > 140 mm LCC fue superior: 3 de 21, y 6 de 23 respectivamente. Indicando poblaciones de individuos con una gran longevidad, probablemente en torno a los 10-11 años de edad, según estimaciones realizadas con datos de crecimiento de las diáfisis femorales versus LCC (Castanet y Báez., 1991).

Todos los individuos de estas tallas máximas eran machos.

Punto de muestreo	LCC	LC	LTotal	LPíleo	APíleo
Punto B	160	280	442	41	19,8
Punto C	150	227	377	33	17
Punto D	161	219	380	41	26
Punto E	163	252	415	46	27
Punto F	180	282	462	44	28
Punto G	181	236	417	50	26
Punto H	161	202	363	38	20
Punto I	167	256	423	44	21
Punto J	167	230	397	44	21
Punto K	171	231	402	40	19
Punto L	134	217	351	30	15
Punto M	137	216	353	32	16
Punto N	163	217	380	46	23
Punto O	170	240	410	48	23
Punto P	156	193	349	39	17
Punto Q	143	156	299	35	16
Punto R	152	96	248	40	20
Punto S	152	232	384	38	18
Punto T	158	170	328	42	21
Punto U	155	225	380	43	21
Punto V	127	220	347	33	16

 Tabla 3. Datos máximos de LCC obtenidos en cada punto de muestreo (expresado en mm).

2.3.2. Diversidad haplotípica.

Se analizaron 90 secuencias con 1027 pb de longitud. De las cuales se obtuvieron 88 haplotipos con un valor de Hd (diversidad haplotípica) de 0.995. La composición media de bases fue 0.26 (T), 0.32 (C), 0.27 (A) y 0.13 (G).

Number of sequences: 90 Number of sequences used: 90				
Selected region: 1-1027 Number of sites: 1027				
Total number of sites (excluding sites with gaps / missing data): 1027				
======= Haplotype Distribution ======				
Number of haplotypes, h: 88				
Haplotype diversity, Hd: 0,9995				
Hap_1: 2 [6H 10H] Hap_3: 1 [12H]				
Hap_2: 1 [15H]	Hap_4: 1 [17A]			

Hap_5: 1 [8A]	Hap_39: 1 [22J
Hap_6: 2 [16A 14N]	Hap_40: 1 [23J]
Hap_7: 1 [11A]	Hap_41: 1 [11K]
Hap_8: 1 [1B]	Hap_42: 1 [12K]
Hap_9: 1 [2B]	Hap_43: 1 [17K]
Hap_10: 1 [20B]	Hap_44: 1 [19K]
Hap_11: 1 [21B]	Hap_45: 1 [1L]
Hap_12: 1 [1C]	Hap_46: 1 [2L]
Hap_13: 1 [9C]	Hap_47: 1 [2M]
Hap_14: 1 [20C]	Hap_48: 1 [3M]
Hap_15: 1 [4D]	Hap_49: 1 [1M]
Hap_16: 1 [6D]	Hap_50: 1 [4N]
Hap_17: 1 [9D]	Hap_51: 1 [6N]
Hap_18: 1 [10D]	Hap_52: 1 [9N]
Hap_19: 1 [8E]	Hap_53: 1 [15N]
Hap_20:1 [9E]	Hap_54: 1 [130]
Hap_21:1 [12E]	Hap_55: 1 [200]
Hap_22:1 [15E]	Hap_56: 1 [230]
Hap_23: 1 [1F]	Hap_57: 1 [240]
Hap_24: 1 [3F]	Hap_58: 1 [250]
Hap_25: 1 [6F]	Hap_59: 1 [9P]
Hap_26: 1 [10F]	Hap_60: 1 [13P]
Hap_27: 1 [14F]	Hap_61: 1 [17P]
Hap_28: 1 [2G]	Hap_62: 1 [19P]
Hap_29: 1 [18G]	Hap_63: 1 [20P]
Hap_30: 1 [22G]	Hap_64: 1 [9Q]
Hap_31: 1 [15I]	Hap_65: 1 [12Q]
Hap_32: 1 [17I]	Hap_66: 1 [15Q]
Hap_33: 1 [18I]	Hap_67: 1 [17Q]
Hap_34: 1 [24I]	Hap_68: 1 [2R]
Hap_35: 1 [25I]	Hap_69: 1 [21R]
Hap_36: 1 [7J]	Hap_70: 1 [24R]
Hap_37: 1 [12J]	Hap_71: 1 [33R]
Hap_38: 1 [16J]	Hap_72: 1 [35R]

Hap_73: 1 [6S]	Hap_81: 1 [22T]
Hap_74: 1 [12S]	Hap_82: 1 [7U]
Hap_75: 1 [13S]	Hap_83: 1 [13U]
Hap_76: 1 [15S]	Hap_84: 1 [19U]
Hap_77: 1 [22S]	Hap_85: 1 [1V]
Hap_78: 1 [6T]	Hap_86: 1 [2V]
Hap_79: 1 [7T]	Hap_87: 1 [3V]
Hap_80: 1 [18T]	Hap_88: 1 [4V]

Tabla 4. Listado de haplotipos del ADN mitocondrial identificados en 90 individuos. La letra define la localidad del punto de muestreo y el número al individuo.

2.3.3. Reconstrucción filogenética.

Las relaciones filogenéticas obtenidas con la aplicación de una Median Joining (MJ) hizo que los descendientes de los nodos se pudieran agrupar en 6 clados o haplogrupos principales. Observándose algunas reticulaciones y cubos, que podrían señalar fenómenos de homoplasia. Los vectores medianos se pueden interpretar biológicamente como secuencias actuales no muestreadas, o como secuencias ancestrales ya extintas.

La red de haplotipos (ver Anexo II), presenta un eje central en el que el haplotipo 53 (individuo de Tasartico), estaría conectado al haplotipo 4 (individuo de Mogán) y al haplotipo 39 (individuo de Agaete), y a partir de este rombo central creado por ellos, surgirían los distintos haplogrupos, unidos por medio de los vectores. El clado marcado de amarillo, sería el predominante en la localidad de Guía (Norte de la isla). El clado coloreado de lila, estaría localizado principalmente en la localidad de la Atalaya de Santa Brígida (Noreste); el clado marcado de celeste sería predominante en la localidad de Telde (Este); el clado coloreado de rojo indicaría la localidad de Tasartico (Suroeste) principalmente; el clado marcado de fucsia representaría las localidades del centro de la isla, tales como el Barranco del Laurel y Tejeda. Y finalmente el clado coloreado de verde, estaría agrupando fundamentalmente a los haplotipos localizados en el oeste de la isla, con localidades como Tamadaba. Clados, que fueron

representados geográficamente en un mapa de la isla de Gran Canaria, especificándose el número de individuos muestreados y su pertenencia a cada uno de los 6 clados. Ya que aunque hubieron 5 localidades en las que únicamente se obtuvo un clado preponderante: Teror, La Atalaya de Santa Brígida, Tamadaba, Artenara y Barranco del Laurel, en todos los demás puntos se obtuvieron distintos grados de mezcla. Pero dado que MJ no es a veces muy apropiado para la reconstrucción de filogenias con ramas muy largas (Bandelt *et al.*, 1999), como se obtuvo en el caso de los clados coloreados de verde, lila y amarillo, se optó por combinar MJ con otros métodos de análisis estadísticos para la identificación de los linajes principales, y poder hacer comparaciones entre los resultados obtenidos.



Figura 10. Mapa que representa las relaciones entre haplotipos resultantes de la MJ.

El estudio de la filogenia mediante la aplicación de una Minimum spanning network (MSN) resultó en la obtención de 8 clados conectados por un evidente eje central (ver Anexo III), formado nuevamente por el haplotipo 4 (individuo de Mogán) junto con el haplotipo 39 (individuo de Agaete) sin posiciones perdidas entre ellos, y el haplotipo 2 (San Isidro). El haplotipo 53 (individuo de Tasartico) también aparece conectado directamente al haplotipo 4, como con los resultados de la MJ, pero no forma parte de ese eje principal. Igualmente, se vuelven a confirmar los grandes niveles de divergencia para algunos de los individuos: haplotipo 79 (individuo hembra grávida del Barranco de Arguineguín), haplotipo 67 (individuo juvenil del Barranco de Guayadeque)... que llegan a presentar hasta 9 pasos mutacionales de diferencia con los otros individuos. La longitud de las ramas sería representativa de las distancias de conexión, mientras que los nodos negros se corresponderían con haplotipos no presentes en el análisis o perdidos.

Hubo algunas diferencias al identificarse los linajes principales, evidentemente al trabajar ambos programas con algoritmos diferentes, y al haberse aplicado estadísticos distintos: una MJ y una MSN. Con la MSM se definieron 2 haplogrupos más, pero hubo también coincidencias como en la asignación de las mismas agrupaciones de haplotipos en HapStar para los clados marcados de amarillo, lila y verde en Network, junto con la identificación de los mismos individuos divergentes, lo cual indica la robustez de los resultados obtenidos. Nuevamente las localidades L (Tamadaba), M (Bco.del Laurel), G (Teror) y D (La Atalaya de Sta. Brígida) no presentaron mezclas de clados, junto con H (San Isidro); mientras que en los demás puntos de muestreo hay diversos grados de interacción entre los 8 clados definidos.



Figura 11. Mapa que indica la distribución de los clusteres de los haplotipos identificados por el Minimum Spanning Network. Con gráficos circulares indicando el número de muestra de cada clado en las distintas localidades.

Finalmente, para la aplicación de la inferencia bayesiana (BEAST) en el estudio de las relaciones filogenéticas de *G.stehlini*, se eligieron los modelos de substitución transversional (TVM +I+G), equivalente al GTR en BEAST para las posiciones 1+2, y el modelo de substitución HKY+I+G (Hasegawa *et al.*, 1985) para la tercera posición. Se obtuvieron valores de ESS (tamaño efectivo de muestra) superiores a 800, indicativo de una buena convergencia de las cadenas y de los priores.

El árbol consenso resultante de los 10.000 árboles obtenidos, fue el árbol que en sus muestras posteriores obtuvo la máxima credibilidad de las probabilidades de los clados posteriores. Como era de esperar, la reconstrucción basada en el modelo de Nacimiento-muerte, muestra unos intervalos con un 95% HPD (representa al intervalo más compacto del parámetro seleccionado que contiene al 95% de la probabilidad posterior, es el análogo Bayesiano al intervalo de confianza) mayores a medida que se retrocede en el tiempo (Stadler *et al.*, 2013), al permitir un número mayor de cambios en la estimación de los tamaños poblacionales que los métodos coalescentes.



Figura 12. Árbol consenso bayesiano en el que sólo los clados con una probabilidad del 95% HPD presentan la barra dibujada.



Figura 13. Cladograma con los tiempos medios de divergencia estimados al 95%HPD. Los valores sobre las ramas representan las probabilidades posteriores.

Se identificaron 8 clados principales: un clado (coloreado de amarillo) nuevamente formado por los puntos de muestreo B y C, que estaría localizado en el norte de la isla; otro clado (coloreado de azul), representado en los puntos T, R, S, U y en V, F en menor medida, que se localizaría en la zona del sureste de Gran Canaria; un tercer clado (coloreado de rojo) que nuevamente estaría al cien por ciento en la localidad L (Tamadaba), y distribuida por las demás localidades siguiendo un transepto NO-SE. El clado coloreado de lila estaría localizado en la localidad D (La Atalaya de Santa Brígida) con un patrón de

expansión hacia el sureste de la isla. El clado marcado de verde nuevamente predominaría en K (Artenara) expandiéndose por el oeste. El sexto clado (celeste) sólo estuvo presente en el punto P (Telde) y en el punto F (Tejeda). Los dos últimos clados fueron mayoritarios en el punto G (Teror; coloreado de naranja) y en el punto M (Barranco del Laurel; coloreado de fucsia), pero han sido los que han mostrado una mayor expansión geográfica; así pues el clado fucsia estaría representado en 9 de los 22 puntos de muestreo, mientras que el clado naranja lo estaría en 6 de los 22 puntos.

En cuanto a la estimación de los tiempos de divergencia entre los distintos clados, el clado azul (Sur de la isla) sería el más antiguo con un tiempo estimado de divergencia de 12,4 Ma del resto de los clados. Siguiéndole el clado amarillo (Norte) con un tiempo estimado de divergencia de 11,3 Ma; el clado fucsia habría divergido hace unos 9,32 Ma de los otros clados; el clado rojo habría divergido hace 8,28 Ma. Hace 7,25 Ma habrían divergido el clado lila del clado verde, y los clados coloreados de naranja y de celeste. Llegando estos tiempos estimados de divergencia hasta un límite inferior de 1,03 Ma para algunos de los haplotipos. Nuevamente el individuo 7T (haplotipo 79) aparece como uno de los ejemplares más divergentes de todos los muestreados.



Figura 14. Mapa con la distribución geográfica de los resultados de la inferencia Bayesiana del ADN mitocondrial de *G.stehlini*. Las localidades de muestreo están coloreadas según la pertenencia de sus individuos a cada uno de los 8 clústeres.

2.4. Discusión.

La isla de Gran Canaria es interesante para el estudio de patrones filogeográficos, debido a su edad geológica y a la diversidad tan amplia de nichos disponibles que ofrece, asociados a las distintas altitudes que presenta, extensión de la isla, y microclimas.

Estudios filogeográficos ya se habían realizado con los dos otros saurios que cohabitan en la isla con *G.stehlini*. De este modo, en *Tarentola boettgeri* se identificaron 5 clados de haplotipos, relacionados a procesos vicariantes resultantes de la actividad volcánica de la isla, con un tiempo de divergencia de 11.0-4.6 Ma entre los dos clados principales. Coincidiendo con un período estable, antes del ciclo de actividad del Roque Nublo y Llanos de la Pez. Con mezclas de haplotipos mitocondriales, únicamente en la vertiente este de la isla. Representando estos linajes mitocondriales, procesos volcánicos de más de 2 Ma, debido probablemente a su poca capacidad de dispersión y filopatría en las hembras. Mientras que su variación morfológica estaría asociada a variables ambientales más que a sucesos históricos (Gübitz *et al.*, 2005).

La otra especie de reptil, *Chalcides sexlineatus* habría colonizado las isla mucho más recientemente, alrededor de unos 3.5 Ma (Brown y Pestano, 1998). En un principio, se reconocieron tres linajes: norte, sureste y suroeste (Pestano y Brown, 1999) debidos a procesos históricos de vicarianza, como consecuencia de la actividad volcánica de la isla. Estando las diferencias fenotípicas observadas en esta especie, relacionadas con adaptaciones a variables ambientales nuevamente. Estudios posteriores, han profundizado en el análisis de estos linajes, definiendo 4 linajes mitocondriales: norte, sureste, sur y oeste, y dos clusteres nucleares: norte y sur (Suárez *et al.*, 2014). Asociándose estos resultados a procesos históricos de divergencia en alopatría y divergencias ecológicas, como ya se había conjeturado, pero se añade la idea de diversidad fenotípica asociada a distintas estrategias antidepredadoras.

Se estima la colonización de Gran Canaria por *Gallotia stehlini* hace unos 11-13 Ma, procedente de las islas orientales del archipiélago (Cox *et al.,* 2010), coincidiendo con el ciclo I de actividad volcánica que afectó a la costa oeste de Gran Canaria y formó el complejo geológico de Tejeda-Fataga. Sedimentos miocénicos se encuentran actualmente localizados en el sur y en

algunos puntos del norte de la isla (Rodríguez-González *et al.*, 2009). Esto concordaría con dos de los clados que aparecen bien delimitados en los tres análisis (MJ-MSN- inferencia Bayesiana), con unos posteriores de valor máximo, y cuyas estimaciones de los tiempos de divergencia son las más antiguas: con un clado basal que representaría al sur de la isla, con un tiempo estimado de divergencia de 12.4 Ma del resto de los clados. Resto de clados, que se subdivirían en un clado localizado en dos localidades puntuales del norte de la isla (Guía y Arucas), cuya edad estimada estaría en torno a los 11.3 Ma; y otros dos clados con una distribución noreste-suroeste, y una distribución noroeste para el último. En general todas la edades iniciales de divergencia de los clados obtenidos giran en el intervalo de 14- 7.5 Ma, con lo que *G.stehlini* nada más llegar a la isla habría experimentado una gran diversificación.

Una posible explicación a estos patrones de distribución filogeográfica se sustentan en los procesos de vicarianza sufridos por *G.stehlini*. Durante la formación del complejo del Roque Nublo (5-3.4 Ma), con sus violentas erupciones, probablemente se extinguieron gran parte de las poblaciones, sobreviviendo las localizadas en los ambientes costeros (Marrero y Ortega., 2001) que recolonizarían nuevamente las zonas devastadas. De ahí la gran expansión que muestra el clado azul, que a partir de sus puntos costeros, ejemplo de ello es el individuo 7T (Arguineguín) que se encuentra en la base del árbol bayesiano (siendo uno de los individuos más divergentes), colonizaría toda la franja que se distribuye desde el suroeste de la isla hacia el centro de la misma, probablemente haciendo uso de la existencia de los ancestrales barrancos de los campos de volcanes del Mioceno: barranco de Fataga, barranco de Arguineguín y barranco de Mogán.

El clado amarillo habría permanecido aislado en el norte, y no ha presentado procesos de expansión. Quedando a modo de refugio, debido probablemente a la actividad presentada en el norte de la isla durante el Plio-Cuaternario (3.4 Ma-actualidad). Ya que el grupo volcánico de La Isleta, delimitó con una cresta NE-SO toda la franja norte, desde La Isleta hacia el centro de Gran Canaria. Resultando diferenciados los clados amarillo, fucsia, rojo y verde (oeste de esta franja) de los clados naranja, lila y celeste (este de esta franja). Clados, que luego también en este período post-Roque Nublo mostraron procesos de expansión, siguiendo un patrón NO-SE dentro de sus

dos sectores iniciales, como se aprecia claramente en los clados rojos y lila, explicándose por la existencia de una cadena o "rift" volcánico de 2 km de ancho y 12 km de largo en sentido NO-SE que cruzó la parte superior de la isla, coincidiendo con el contacto entre el viejo suroeste y el joven noreste (Guillou et al., 2004). Y definiéndose el centro de la isla (Tejeda) como una zona de contacto secundario en el que se encontrarían representantes de los clados del norte, del sur del este y del oeste.

Así pues esta estructura diferenciada de distintos haplogrupos o clados, estaría relacionada con procesos vicariantes históricos; los cuales habrían mantenido una cierta divergencia a pesar de los altos niveles de introgresión que muestran. Con lo cual, prevalecería la divergencia genética a pesar de los altos niveles de migración. Con una reconstrucción filogenética, más similar al patrón exhibido por *Tarentola* sp que a *Chalcides* sp como cabría esperar, al tratarse de dos especies que colonizaron Gran Canaria durante el Mioceno, aunque con los distintos clados delimitados por unos límites más difusos en *G.stehlini*.



Figura 15. Comparación entre las distribuciones de los linajes mitocondriales de *G.stehlini*, *Tarentola boettgeri* (Gübitz *et al.*, 2005) y *Chalcides sexlineatus* (Suárez *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 3: ADN NUCLEAR

3.1. Microsatélites.

Los componentes de secuencias constituidas por unidades repetidas en cadena, de los genomas complejos, se pueden clasificar en tres categorías: a) satélites, con tamaños de hasta 5Mb, y asociados normalmente a centrómeros; b) microsatélites o SSR¹, normalmente de 10-50 copias, con una longitud entre 1 y 10 pares de bases, predominando tamaños entre 2-5 pares de bases, tales como (TG)_n o (AAT)_n (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989); y c) minisatélites.

La existencia de loci de microsatélites en los genomas de eucariotas ha sido conocida desde los años setenta, aunque no se demostró su amplia distribución hasta que se descubrieron múltiples copias del "motif" poli (dT-dG)_n desde levaduras hasta vertebrados (Hamada *et al.*, 1982). Este descubrimiento fue verificado al hibridarse distintas secuencias de microsatélites con ADN genómico procedente de diversos organismos, encontrándose la presencia de secuencias simples o microsatélites en todos ellos (Tautz y Renz, 1984).

En 1985, el descubrimiento por Jeffreys *et al.*, de repeticiones encadenadas hipervariables en el genoma humano, con un mayor número de repeticiones, de hasta varios cientos de copias con secuencias de 10-100 pares de bases, fue definido como minisatélites. El uso de estas secuencias para los estudios de identificación, abrió un nuevo campo con aplicaciones en la determinación del origen de muestras biológicas, paternidades, y mapeo genómico.

Los microsatélites aunque individualmente no exhiban los niveles de variabilidad presentados por los minisatélites, lo compensan con su gran abundancia en los genomas de una gran variedad de especies, y por ser mucho más sencillos de aislar que los loci de los minisatélites. Son muy polimórficos, especialmente si tienen secuencias largas y sin interrupciones, y por esa razón son útiles marcadores genéticos. La tasa de mutación en los loci de los microsatélites es elevada, con estimaciones *in vivo* en torno a 10^{-2} veces por locus y por replicación, en *E.coli* (Levinson y Gutman, 1987), mientras que estudios en ratones dieron estimaciones de 10^{-4} y 5 x 10^{-6} (Edwards *et al.*,

¹ Simple sequence repeats

1992), en contraste con la tasa de mutación para mutaciones puntuales, que está en el orden de $10^{-9} - 10^{-10}$. Hay dos tipos de modelos que pueden explicar estas tasas tan elevadas de mutación: el primero, cuyas siglas en inglés son SSM², implica una única doble hélice de ADN y un deslizamiento de la cadena complementaria durante la replicación del ADN (Levinson y Gutman 1987). Sugiriéndose, que los nuevos tamaños de los alelos se generarían mediante deslizamientos intra-alélicos de la polimerasa durante la replicación. Esto causaría que la cadena molde y la nueva replicada estén temporalmente sin alinearse, pero para que la replicación finalice ambas cadenas deben alinearse nuevamente, con lo que si este realineamiento llega a ser imperfecto, es cuando se originarían las nuevas mutaciones (Tautz y Schlötterer, 1994). El segundo modelo, denominado UCO³, implica recombinación entre cromosomas homólogos que no estén perfectamente alineados, dando lugar a cruzamientos desiguales entre las repeticiones de los microsatélites.

Actualmente la mayoría de los estudios sugieren a SSM como el principal causante de la inestabilidad observada en los microsatélites, sin embargo ambos modelos no son necesariamente excluyentes entre sí. Pudiendo considerarse el proceso mutacional en los microsatélites, como un balance entre la generación de errores por cualquiera de estos dos modelos, y la corrección de dichos errores, por medio de exonucleasas y la proteína MutS (Modrich, 1991).

3.2. Aplicaciones y limitaciones.

La principal ventaja en la aplicación de marcadores genéticos, se basa en la variedad de caracteres que revelan, excediendo a los obtenidos por métodos morfológicos y bioquímicos. Hace treinta años todos los mapas genéticos consistían en unos pocos marcadores fenotípicos (morfológicos), y/o isoenzimas, y al ser marcadores limitados, los mapas obtenidos sólo resultaban con unos cuantos marcadores por cromosoma. Desde entonces, con el avance

² Slip-strand mispairing

³ Unequal crossing-over

de las tecnologías de marcadores de ADN, la mayoría de los mapas genéticos actuales tienen cientos de marcadores (Kurata y Sasaki, 1997).

En muchas especies, los microsatélites son marcadores relativamente sencillos de obtener, o bien a través del aislamiento de marcadores específicos de la especie, lo cual conlleva la creación de una librería genómica del ADN (Armour *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 1999), o por medio de la aplicación de marcadores originalmente aislados de especies similares. Se pueden usar distintos loci, según su nivel de variación, con lo que tienen el potencial para exhibir un gran grado de polimorfismo, pudiéndose ver las frecuencias de distribución de las variantes en la longitud de los microsatélites, desde una perspectiva genealógica (Donnelly y Tavaré, 1995). Lográndose observar realizaciones independientes del mismo proceso, mediante la combinación de datos procedentes de diversos loci, infiriéndose la genealogía, y consecuentemente la historia demográfica de la población.

Son sencillos de automatizar con el uso de reacciones de PCR, aunque pueden surgir problemas relacionados con esta técnica, como la no amplificación de ciertos alelos debido a substituciones, inserciones o deleciones en los puntos de reconocimiento de los primers, lo cual puede causar la aparición de aparentes alelos nulos en estudios poblacionales (Pemberton *et al.*, 1995), clasificando falsamente a individuos heterocigotos como homocigotos. Otra última limitación, se encuentra en la homoplasia, al mutar al mismo alelo en un locus, dos individuos que proceden de distintos ancestros; lo cual es más común en microsatélites que en otros marcadores, debido a las restricciones en los rangos de tamaño de los alelos y a las altas tasas mutacionales (Barkley *et al.*, 2009).

3.3. Material y métodos.

3.3.1. Amplificación de los microsatélites.

Se genotiparon un total de 443 individuos de las mismas muestras de ADN que habían sido aisladas y conservadas para el estudio del ADN mitocondrial. Los primers utilizados fueron originalmente diseñados para *G.atlantica* (Bloor *et al.*, 2006). Se seleccionaron 5 parejas de primers para optimizar sus condiciones de amplificado mediante la reacción de PCR en *G.stehlini*, de los que únicamente amplificaron 4: Gat2, Gat3, Gat4 y Gat5. Se realizó un multiplex con estos 4 loci, para maximizar el uso de los reactivos y el tiempo, con las siguientes condiciones de amplificación: 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.4X tampón, 0.5 U Taq polimerasa, 10 ng ADN, y 0.1-0.45 µM de cada primer, en un volumen final de reacción de 10µl. Seguido de una reacción de PCR con una desnaturalización a 94°C (3min), 25 ciclos a 94°C (30s), una temperatura de anillamiento de 54°C (30s) y 72°C (1min), con una extensión final de 72°C (10min).



Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación de microsatélites en G. stehlini.

Un primer de cada una de las parejas fue marcado fluorescentemente con 6-FAM (Gat2 y Gat5), PET (Gat3) y VIC (Gat4). Realizándose la carrera de los fragmentos en el analizador genético ABI Prism[®] 3100 (Applied Biosystems), con el marcador de peso molecular interno GeneScanTM 500[®] LIZ. Para ello se añadieron 0.5 µl de este marcador, 1 µl de la muestra y 10 µl de formamida, se desnaturalizó a 95°C (3min), y tras ponerlo en hielo 5 minutos se realizó la electroforesis en el secuenciador. Los electroferogramas obtenidos fueron visualizados con el software ABI PRISM[®] GeneScan[®] y con el programa *Peak Scanner* software v 1.0.

3.3.2. Análisis de los datos genéticos.

3.3.2.1. Diversidad genética.

Los resultados estadísticos de las diversas frecuencias de los datos codominantes se obtuvieron tras la aplicación del programa GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2006, 2012). Los parámetros analizados fueron: el estado de equilibrio de Hardy-Weinberg que se calculó para cada locus por separado aplicando una chi-cuadrada de Pearson; el número promedio de alelos por locus; el índice de fijación (F) o "coeficiente de consanguinidad"; la heterocigosidad observada y esperada, y la proporción de loci polimórficos.

El índice de fijación F, es la probabilidad de que dos alelos de un locus determinado de un individuo, sean idénticos por descendencia. Valores en torno a cero indican apareamiento al azar, valores positivos indican endogamia, y valores negativos indican selección heterótica o exceso de heterocigotos respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg.

3.3.2.2. Diferenciación y estructura poblacional.

La subestructuración poblacional se estudió con los coeficientes F de Wright que describen la estructura de la variación genética en una población subdividida, pudiéndose emplear para medir la deriva génica y el flujo entre poblaciones. La definición original de Wright, se basa en el coeficiente de endogamia, con lo que F_{it} se correspondería con la endogamia total a un nivel metapoblacional; F_{is} sería el componente debido a apareamientos no aleatorios a un nivel intrapoblacional, y cuantifica el alejamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg; y F_{st} sería la medida de subdivisión genética entre poblaciones. El rango de valores de F_{st} varía de 0 (no existe divergencia genética) hasta 1 (fijación para alelos alternos en diferentes subpoblaciones).

El uso de los coeficientes F de Wright asume que todas las subpoblaciones han derivado de un mismo ancestro que estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg y en equilibrio de ligamiento, y que han experimentado los mismos procesos evolutivos desde su divergencia. Pero esto no es así siempre en la naturaleza, haciéndose necesario el uso de métodos basados en la

formación de agrupamientos o clústeres, para inferir la estructura poblacional. Para ello se utilizó el programa STRUCTURE 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), el cual usa una aproximación sistemática Bayesiana para la creación de clústeres, con la aplicación de estimaciones del método de Monte Carlo. Este modelo de clústeres con K poblaciones, será caracterizado por las frecuencias de los alelos en cada locus estudiado para formar los grupos entre las muestras estudiadas. Como modelo de análisis se optó por el modelo de mezcla, en el que se supone que cada individuo "i" ha heredado alguna fracción de su genoma de un ancestro en la población "k". Dándonos las estimaciones de las medias posteriores de estas proporciones. El modelo utilizado para las frecuencias alélicas fue el modelo correlacionado (Falush *et al.*, 2003), con lo que se asume que existe un nivel de dependencia en las frecuencias alélicas, siendo un análisis más conservativo. En contrapartida, tiene una gran capacidad de detectar distintas poblaciones aunque estén altamente relacionadas.

Se aplicó un burnin de 100.000 para 200.000 generaciones con valores de K entre 1-10, y con 10 interacciones para cada valor de K. Las probabilidades de asignación (Q) para los individuos y para las poblaciones en cada clúster se trazaron con el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012). Posteriormente se aplicó CLUMPP (Jakobsson y Rosenberg, 2007) con el algoritmo LargeKGreedy, para identificar el mejor alineamiento de los resultados de las réplicas de los análisis de clústeres, y finalmente, los resultados se visualizaron mediante DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004).

3.4. Resultados.

3.4.1. Características de los microsatélites y desviaciones de HWE.

La primera observación fue la diferencia en los rangos de tamaño de los microsatélites amplificados entre *G.atlantica* y *G.stehlini*. Como cabía esperar, ya que los microsatélites amplificados en especies cercanas, comparten estados evolutivos de similar longitud, pero los límites superiores de estos loci

homólogos pueden ser muy largos y variables en una de las especies, y muy cortos y monomórficos en la otra (Ellegren *et al.*, 1997).

El número promedio de alelos por locus varió de 2 a 13 para los loci Gat2 y Gat3, y de 1-2 alelos por loci para Gat4 y Gat5. Todos los loci fueron polimórficos para todas las localidades, menos el locus Gat5 que fue monomórfico para los puntos C, G, L, O, R, S y T, y el locus Gat4 que también resultó monomórfico en el punto V. El valor medio de la heterocigosidad observada fue de 0.462±0.037, y el valor medio de la heterocigosidad esperada fue de 0.481±0.034 (ver Anexo IV para valores de H_o y H_e desglosados por punto de muestreo).

Locus	Número de alelos	Rango de Tm de los alelos (pb)		H _o	H _e
		G.stehlini	G.atlantica		
Gat2	2-13	135-205	183-209	0.858±0.026	0.805±0.737
Gat3	2-13	91-144	103-215	0.653±0.044	0.737±0.022
Gat4	1-2	130-134	161-308	0.292±0.033	0.280±0.029
Gat5	1-2	364-368	397-442	0.047±0.013	0.102±0.027

Tabla 6. Datos de los microsatélites amplificados en *G.stehlini*. H_o y H_e se correponden con la heterocigosidad observada y esperada promedio, para cada locus respectivamente.

De los 22 puntos de muestreo, aquellos que se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg tras aplicar una chi-cuadrada de Pearson, fueron A, B, N y P, para el locus Gat5 dando estadísticamente altamente significativo con un nivel de significación (p<0.001). Mientras que A, B, H, I, Q dieron significativo (p< 0.005) para el locus Gat3. El punto N dio también significativo para el locus Gat2, y finalmente el punto Q para el locus Gat5. Indicando que en estos 7 puntos de muestreo se estaría dando algún tipo de fuerza evolutiva: selección, flujo genético, deriva genética, o procesos de mutación, que estarían modificando el equilibrio de Hardy-Weinberg de esas poblaciones.

Punto de muestreo	Gat2	Gat3	Gat4	Gat5
A: Mogán		p< 0.005		p<0.001
B: Guía		p< 0.005		p<0.001
H: San Isidro		p< 0.005		
I: Gáldar		p< 0.005		
N: Tasartico	p< 0.005			p<0.001
P: Telde				p<0.001
Q: Barranco de Guayadeque		p< 0.005		p< 0.005

 Tabla 7. Loci alejados del equilibrio de Hardy-Weinberg por localidad.

3.4.2. Estructura poblacional: estadística descriptiva.

Valores negativos del índice de fijación F, se obtuvieron para dos o más de los cuatro loci en 16 de los 22 puntos de muestreo del estudio. Con el caso extremo del punto J, en el que los cuatro loci dieron negativo, mostrando un exceso de heterocigosidad. Lo contrario sucedió para los 5 puntos restantes: A-B-P-Q-S-V, en los que se obtuvieron resultados cercanos al cero, indicando fenómenos de apareamiento al azar; pero de endogamia (con un valor de 1) para el locus Gat5 (en los puntos B y V) y para el locus Gat3 (en los puntos M y P). No obstante, el valor medio de este índice considerando a todos los puntos muestreados y por loci, indicaría una selección heterótica o emparejamientos selectivos para Gat2 y Gat4, y la prevalencia de los apareamientos al azar para Gat3 y Gat5.

Locus	F	F _{is}	F _{it}	F _{st}	N _m
Gat2	-0.078 ±0.035	-0.066	0.039	0.098	2.309
Gat3	0.123 ± 0.062	0.114	0.205	0.103	2.186
Gat4	-0.044± 0.038	-0.042	0.047	0.086	2.658
Gat5	0.337 ±0.103	0.534	0.592	0.126	1.737

Tabla 8.Valores medios del índice de fijación F, de los índices estadísticos deF de Wright, y del número de migrantes efectivos, por loci y poblaciones.

Para los coeficientes F de Wright, los valores promedio que se han obtenido para los 4 loci de F_{st} están en el intervalo de 0.08-0.12. Valores bastante distantes del valor máximo posible para F_{st} , con lo que el análisis indicaría una diferenciación genética moderada (Hartl y Clark, 1997) para las frecuencias alélicas, en los distintos puntos de muestreo estudiados. Lo cual corrobora los datos anteriores obtenidos de selección heterótica, ya que al no haber prácticamente diferenciación genética entre poblaciones, no habría reducción en la heterocigosis, con un fenómeno de sobredominancia o favorecimiento del genotipo heterocigoto por parte de la selección natural, manteniéndose el polimorfismo. Igualmente, los valores negativos del índice F_{is} para Gat2 y Gat4 estarían confirmando la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg de estos dos loci en las distintas subpoblaciones.

El estimador N_m , nos estaría indicando el número de migrantes efectivos. El valor promedio de N_m para todas las poblaciones y con los 4 loci fue de 2.222 (± 0.190), valor intermedio entre 0-4, con lo que habría un cierto desequilibrio a favor del flujo genético y no de la deriva genética como fuerza evolutiva que estaría actuando, ya que valores altos indicarían prevalencia del flujo genético mientras que valores bajos indicarían que la deriva genética estaría actuando independientemente en cada una de las poblaciones.

3.4.3. Parámetros poblacionales históricos: detección de mezcla genética intraespecífica.

Con STRUCTURE los mejores clústeres son aquellos que aplican los datos más realistas de K, para ello es aconsejable obtener el menor valor de K que maximice la probabilidad total de los datos (Kalinowski, 2011). K=4 fue la mejor inferencia del valor de K, calculada según la tasa de cambio de segundo orden de la probabilidad (Evanno *et al.*, 2005). Con un valor de Δ K= 5.739741 para 4 poblaciones, siendo el segundo valor más alto un Δ K= 2.943614 para 8 poblaciones.



Figura 16. Gráfico resultante de los análisis de ΔK .

Con lo cual se distinguieron 4 clústeres genéticamente, representados en el siguiente gráfico de barras poblacional, en el que se apuntan las 22 localidades estudiadas.



Figura 17. Estructura genética poblacional, inferida para K=4 y 4 loci de microsatélites.

En general, los grupos estuvieron relacionados con sus localidades geográficas, con valores de r<1 (en el intervalo 0.1881-0.4762 para cada una de las interacciones). Este parámetro indica, cuando es menor que uno, que existe una estructura poblacional, y que ésta es dependiente de las localidades muestreadas. El clúster I (amarillo) obtuvo su mayor valor de Q= 0.6772 en la localidad 2 (Punto de muestreo B: Guía- Norte de Gran Canaria). El clúster II (rosa) predominó en la localidad 19 (Punto de muestreo S: Arinaga- Sureste) con un valor de Q=0.8116. El clúster III (fucsia) con un valor de Q=0.8316 predominó en la localidad 15 (Punto de muestreo O: embalse Caidero de la

Niña- Suroeste), y el clúster IV (verde) obtuvo su máximo valor Q= 0.91 en la localidad 10 (Punto de muestreo J: Agaete- Noroeste).Todos los clústeres presentan individuos mezclados de los otros clústeres, en mayor o menor proporción, lo cual indica un gran flujo genético entre las poblaciones. Pero sí, se pueden marcar los 4 linajes principales, teniendo en cuenta el clúster predominante en cada punto muestreado. De tal modo que el clúster I estaría formado por: Guía- Tejeda- Gáldar- Barranco del Laurel y Tasartico. El clúster II englobaría a: Telde- Arinaga- Arguineguín- Mogán- Arucas- San Mateo- San Isidro y Tamadaba. Del clúster III serían: Artenara y Caidero de la Niña. Y el clúster IV estaría compuesto por: La Atalaya de Sta. Brígida- Teror- Agaete-Guayadeque- Santa Lucía- Fataga y Ayacata.



Figura 18. Representación geográfica de los 4 clústeres nucleares obtenidos. Cada número se corresponde con un punto de muestreo, y cada color con un clúster: amarillo=clúster I, rosa=clúster II, fucsia=clúster III y verde= clúster IV.

3.5. Discusión.

3.5.1. Desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg.

Los marcadores más informativos y polimórficos fueron Gat2 y Gat3, mientras que los valores obtenidos de una baja variabilidad alélica para los loci Gat4 y Gat5 podrían estar indicando un cuello de botella demográfico, ya que las poblaciones que experimentan una reducción en su tamaño geográfico, muestran frecuentemente una reducida variabilidad genética (Bouzat *et al.*, 1998).

El exceso de heterocigosidad observada (Luikart y Cornuet, 1998) apoya nuevamente la posibilidad de que las poblaciones de *G.stehlini* hayan pasado por un fenómeno de cuello de botella. Ya que la heterocigosis puede reducir el efecto negativo de este fenómeno enmascarando mutaciones deletéreas (Keller y Waller, 2002), y permitiendo la expresión de sobredominancia (Fitzpatrick y Shaffer, 2007), con la emergencia de nuevos genotipos no encontrados en las poblaciones parentales. Favoreciendo la expansión de los rangos de distribución de las diversas subpoblaciones (Praebel *et al.*, 2013), las colonizaciones exitosas y reduciendo el riesgo de extinción a largo plazo de la especie. Apoyado por los valores obtenidos de migrantes efectivos, sin embargo lo complicado es calcular la magnitud del flujo genético necesario para prevenir la evolución independiente de las poblaciones de una especie, ya que ello dependerá de la intensidad de las otras fuerzas evolutivas (Hedrick, 2005).

3.5.2. Estructura poblacional.

Los análisis mostraron una estructura poblacional basada en cuatro clústeres principales: noroeste (con Guía como su localidad representante), noreste (Teror, La Atalaya de Santa Brígida...), sur (con Arinaga, y Mogán como localidades representantes) y oeste (con el embalse Caidero de la Niña como localidad en la que predominó). El clúster representando al noroeste estaría bastante bien diferenciado al igual que el clúster representando al oeste. Mientras que los dos clústeres restantes (noreste y sur) serían los que

estarían mostrando unos índices de expansiones mayores, extendiéndose sus rangos geográficos por toda la franja este de la isla principalmente, aunque se encontrarían presentes, con distintas probabilidades, en cada uno de los 22 puntos de muestreo. Mostrando un gran flujo genético entre las poblaciones. debido probablemente a la gran capacidad de dispersión de Gallotia stehlini, el cual en experimentos en cautividad ha demostrado que exhibe unas velocidades de carrera superiores a la de otros lacértidos (Cejudo y Márquez, 2001) y también debido a fenómenos de desplazamiento competitivo entre los machos adultos y juveniles de G.stehlini (Barquin y Martín, 1982). Lo cual obligaría a que los machos juveniles expandieran sus rangos de distribución en busca de nuevos territorios en los cuales asentarse. Debido a estos grandes niveles de introgresión detectados, es por lo que la estructura poblacional obtenida a nivel nuclear queda reducida a 4 linajes, mientras que a nivel mitocondrial se obtuvieron 8 linajes mitocondriales. No obstante, su representación al nivel geográfico señaló 4 áreas principales, concordantes tanto mitocondrialmente como nuclearmente: norte, sur, este y oeste. Mostrando la vertiente este, los mayores índices de introgresión, con la presencia de zonas de contacto secundario nuevamente en el centro de la isla: Tejeda, San Mateo, como ejemplos. Sin embargo, se ha logrado mantener una considerable diferenciación genética entre las subpoblaciones, debido probablemente a la prevalencia de los fenómenos históricos de vicarianza ante la homogeneidad que pudiera provocar la migración de individuos entre localidades.

CONCLUSIONES

La distribución geográfica de los linajes evolutivos, junto con los patrones de flujo genético entre las zonas de contacto secundario, muestran los procesos de especiación y divergencia de las especies. Éste, constituye el primer estudio realizado a nivel mitocondrial y nuclear del lacértido *Gallotia stehlini,* con el objetivo de discernir la historia evolutiva de esta especie en la isla de Gran Canaria.

Del estudio de una región del citocromo b de 1.027 pb, y con la aplicación de tres métodos de reconstrucción filogenética (MJ, MSN y inferencia Bayesiana), que han mostrado sus índices de robutez al compararse los resultados entre ellos, se han obtenido 8 linajes mitocondriales principales. Con unos tiempos de divergencia de los distintos clados, consistentes con el origen Miocénico de *G.stehlini* en Gran Canaria. Mostrando un patrón filogeográfico relacionado con la actividad volcánica experimentada por la isla durante la formación del complejo del Roque Nublo (5-3.4 Ma), y a la actividad presentada en el norte de la isla durante el Plio-Cuaternario (3.4 Ma-actualidad).

A nivel del ADN nuclear, se estudiaron 4 loci de microsatélites. Los cuales, se alejaron del equilibrio de Hardy-Weinberg. Indicando fenómenos de selección heterótica, con una sobredominancia o favorecimiento de los genotipos heterocigotos por parte de la selección natural. Confirmado con los valores obtenidos de los índices descriptivos estadísticos: índice de fijación F y coeficientes F de Wright. El número de migrantes efectivos (N_m) también indicaría una prevalencia del flujo genético, antes que la deriva genética, como causa de la explicación de estos elevados niveles de heterocigotos.

Las poblaciones se han estructurado a nivel nuclear en 4 clústeres, pero con altos índices de introgresión entre todas las localidades. Explicado probablemente, por la gran vagilidad y comportamiento territorial que muestran los machos adultos de *Gallotia stehlini* desplazando competitivamente a los individuos juveniles.

Los patrones de estructura genética obtenidos y de introgresión, muestran una relativa concordancia citonuclear. Ya que su representación geográfica ha señalado 4 áreas principales, concordantes tanto mitocondrialmente como nuclearmente: norte, sur, este y oeste. A pesar de que
los 4 clústeres nucleares hayan englobado a los 8 linajes mitocondriales, debido a los altos índices de introgresión hallados.

Así pues han prevalecido los fenómenos históricos de vicarianza, a pesar de los altos índices de flujo genético observados, en la explicación del patrón filogeográfico presentado por *G.stehlini*. Es un hecho interesante, que marca el inicio de estudios posteriores más concretos de las zonas de contacto secundario, y de hibridación. Esta estabilidad mostrada, en la estructura poblacional de la especie a lo largo de una gran escala temporal, a pesar de las variaciones en las condiciones ecológicas de los hábitats, migraciones... también ha sido estudiada en especies caribeñas de *Anolis* (Sherratt *et al.*, 2015), abriendo interesantes perspectivas en el estudio de las comunidades ecológicas.

Finalmente añadir, que los datos obtenidos de longitud corporal indican un buen estado general de todas las poblaciones muestreadas, con presencia de individuos con edades alrededor de los 10-11 años en todas ellas; sinónimo de un buen estado de conservación de la especie en la isla. Aunque es recomendable hacer un seguimiento de la misma, debido a la introducción reciente de la serpiente Rey de California (*Lampropeltis getula californiae*) en varios puntos de la isla.

Bibliografía

- Amorim, I.R., Emerson, B.C., Borges, P.A.V. y Wayne, R.K. (2012). Phylogeography and molecular phylogeny of Macaronesian island *Tarphius* (Coleoptera: Zopheridae): why are there so few species in the Azores? *Journal of Biogeography*, *39*, 1583-1595.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R.,
 Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F.,
 Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. y Young, I.G. (1981).
 Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Anguita, F., García Cacho, L., Colombo, F., Gonzalez, A. y Vieira, R. (1991).
 Roque Nublo Caldera: a new stratocone caldera in Gran Canaria, Canary Islands. *Journal of volcanology geothermical research*, *47*, 45-63.
- Armour, J.A.L., Neumann, R., Gobert, S. y Jeffreys, A.J. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, *3*, 599-605.
- Arnold, E.N. (1973). Relationships of the palaearctic lizards assigned to the genera Lacerta, Algyroides and Psammodromus (Reptilia:Lacertidae). Bulletin of the British Museum(Natural History). Zoology, 25, 289-366.
- Ashmole, N.P., Oromí, P., Ashmole, M.J., y Martín, J.L. (1992). Primary faunal succession in volcanic terrain: lava and cave studies on the Canary Islands. *Biological Journal of the Linnean Society*, *46*, 207-234.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E.,
 Reeb, C.A. y Saunders, N.C. (1987). Intraspecific Phylogeography:
 the mithochondrial DNA bridge between population genetics and
 systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *18*, 489-552.
- Avise, J.C. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, *7*, 371-379.
- Avise, J.C. (2000). Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Londres.

- Avise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3-15.
- Bandelt, H.J., Forster, P. y Röhl, A. (1999). Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution*, *16*(1), 37-48.
- Bannert, B. (1998). Reproduction of lacertid lizards from the Canary Islands and Madeira in captivity. *Salamandra, 34* (4), 289-300.
- Barkley, N.A., Krueger, R.R., Federici, C.T. y Roose, M.L. (2009). What phylogeny and gene genealogy analyses reveal about homoplasy in citrus microsatellite alleles. *Plant Systematic Evolution, 28,* 71-86.
- Barquin, J. y Martín, A. (1982). Sobre la presencia de *Gallotia* (= *Lacerta*)
 atlantica (Peters y Doria, 1882) en Gran Canaria (Rept., Lacertidae).
 Doñana, Acta Vertebrata, 9, 377-380.
- Berry, R.J. (1992). The significance of island biotas. *Biological Journal of the Linnean Society*, *4*6, 3-12.
- Bloor, P., De Laguna, I.H.B y Kemp, S.J. (2006). Highly polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for the eastern Canary Island lizard, *Gallotia atlantica*. *Molecular Ecology Notes*, 6, 737-739.
- Bloor, P., Kemp, S.J. y Brown, R.P. (2008). Recent volcanism and mitochondrial DNA structuring in the lizard *Gallotia atlantica* from the island of Lanzarote. *Molecular Ecology*, *17*, 854-866.
- Bofkin, L. y Goldman, N. (2007). Variation in evolutionary processes at different codon positions. *Molecular Biology Evolution, 24* (2), 513-521.
- Breton, S., Beaupre, H.D., Stewart, D.T., Hoeh, W.R y Blier, P.U.(2007). The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *Trends in Genetics*, *23*, 465-474.
- Brown, R.P., Thorpe, R.S. y Báez, M. (1991). Parallel within-island microevolution of lizards on neighbouring islands. *Nature*, *352*, 60-62.
- Brown, R.P. y Pestano, J. (1998). Phylogeography of skinks (*Chalcides*) in the Canary Islands inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, *7*, 1183-1191.
- Brown, R.P., *Hoskisson*, P.A., Welton, J.H. y Báez, M. (2006). Geological history and within-island diversity: a debris avalanche and the Tenerife lizard *Gallotia galloti. Molecular Ecology*, *15*, 3631-3640.
- Busack, S. y Maxson, L.R. (1987). Molecular relationship among Iberian,

Moroccan, and South African Lacertid lizards (Reptilia, Lacertidae). *Amphibia-Reptilia*, *8*, 383-392.

- Carranza, S., Arnold, E.N., Mateo, J.A. y López-Jurado, L.F. (2001). Parallel gigantism and complex colonization patterns in the Cape Verde scincid lizards *Mabuya* and *Macroscincus* (Reptilia:Scincidae) revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268 (1476), 1595-1603.
- Carretero, M.A., Roca, V., Martin, J.E., Llorente, G.A., Montori, A., Santos, X. y Mateos, J. (2006). Diet and helminth pasasites in the Gran Canaria giant lizard, *Gallotia stehlini. Revista Española de Herpetología, 20*, 105-117.
- Castanet, J. y Báez, M. (1991). Adaptation and evolution in *Gallotia* lizards from the Canary Islands: age, growth, maturity and longevity. *Amphibia*-*Reptilia*, *12*, 81-102.
- Cejudo, D. y Márquez, R. (2001). Sprint perfomance in the lizards *Gallotia simonyi* and *Gallotia stehlini* (Lacertidae): implications for species management. *Herpetologica*, *57*(1), 87-98.
- Cioranescu, A. (ed.), *Le Canarien*. Crónica francesa de la conquista de Canarias, (1980): texto64, p61.
- Clement, M., Posada, D. y Crandall, K.(2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, *9*(*10*), 1657-1660.
- Cox, S.C., Carranza, S. y Brown, R.P. (2010). Divergence times and colonization of the Canary Islands by Gallotia lizards. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 747-757.
- Cronk, Q.C.B. (1997). Islands: stability, diversity, conservation. *Biodiversity and Conservation*, *6*, 477-493.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. y Posada, D. (2012). jModeltest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods, 9*(8), 772.
- De la Cruz, V.F., Neckelmann, N. y Simpson, L. (1984). Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae.Journal of biological chemistry*, *259*, 15136-15147.
- Donnelly, P. y Tavaré, S. (1995). Coalescents and genealogical structure under neutrality. *Annual Review of Genetics*, 29, 401-21.

- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. y Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969-1973.
- Earl, D. y 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, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T. y Chakraborty, R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, *12*, 241-253.
- Ellegren, H., Moore, S., Robinson, N., Byrne, K., Ward, W. Y Sheldon, B.C. (1997). Microsatellite evolution- a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution*. *14*, 854-60.
- Emerson, B.C. (2003). Genes, geology and biodiversity:faunal and floral diversity on the island of Gran Canaria. *Animal Biodiversity and Conservation* 26 (1), 9-20.
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005).Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, *14*, 2611-2620.
- Excoffier, L. y Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Lynux and Windows. *Molecular Ecology Resources, 10*, 564-567.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., *et al*(2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299, 1582–1585.
- Farrington, H.L., Lawson, L.P., M Clark, C. y Petren, K. (2014). The evolutionary history of Darwin's finches: speciation, gene flow, and introgression in a fragmented landscape. *Evolution*, 68(10), 2932-2944.
- Fitzpatrick, B.M. y Shaffer, H.B.(2007). Hybrid vigor between native and introduced salamanders raises new challenges for conservation. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, 104*, 15793-15798.
- 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.

- García-Cacho, L., Díez-Gil, J.L. y Araña, V. (1994). A large volcanic debris avalanche in the pliocene Roque Nublo Stratovolcano, Gran Canaria, Canary Islands. *Journal of volcanology and geothermal research*, 63, 217-229.
- Gilpin, M.E. y Soulé, M.E. (1986). Minimum Viable Populations: Processes of Species Extinction, 19-34. Conservation Biology. The Science of Scarcity and diversity. Soulé, M.E. (eds). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- González, P., Pinto, F., Nogales, M., Jiménez- Asensio, J., Hernández, M. y Cabrera V.M. (1996). Phylogenetic relationships of the Canary Islands endemic lizard genus *Gallotia* (Sauria: Lacertidae), inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6(1), 63-71.
- Guillou, H., Torrado, F.J.P., Machín, A.R.H., Carracedo, J.C. y Jimeno, D. (2004). The Plio-Quaternary volcanic evolution of Gran Canaria based on new K-Aragesand magnetostratigraphy. *Journal of volcanology and geothermal research*, 135, 221-246.
- Gübitz, T., Thorpe, R.S. y Malhotra, A. (2000). Phylogeography and natural selection in the Tenerife gecko Tarentola delalandii: testing historical and adaptive hypotheses. *Molecular Ecology*, *9*, 1213-1221.
- Gübitz, T., Thorpe, R.S. y Malhotra, A. (2005). The dynamics of genetic and morphological variation on volcanic islands. *Proceedings of the Royal Society of London, B. 272, 751-757.*
- Hall, T.A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hamada, H., Petrino, M. y Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes.*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 646-6469.

- Hamilton, M.B., Pincus, E.L., Di Fiore, A. y Fleischer, R.C. (1999). Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, *27*, 500-507.
- Harding, R. M. (1996). New phylogenies: An introductory look at the coalescent, pp. 15-22. En: Harvey, P. H., A. J. Leigh Brown, J. Maynard Smith y S. Nee (eds.), New uses for new phylogenies, Oxford University Press, Nueva York.
- Harris, D.J., Arnold, E.N. y Thomas, R.H. (1998). Relationships of lacertid
 lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA
 sequences and morphology. *Proceedings of the Royal Society of London, B.* 265, 1939-1948.
- Hartl, D.L. y Clark, A.G.(1997). Principles of population genetics. Tercera edicion. 542 pp.
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. (1985). Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial dna. *Journal of molecular evolution*, 22, 160-174.
- Haug,G.H., Ganopolski, A., Sigman, D.M., Rosell-Melé, A., Swann, G.E.A., Tiedemann, R., Jaccard, S., Bollmann, J., Maslin, M.A., Leng, M.J. y Eglinton, G. (2005). North Pacific seasonality and the glaciations of North America 2.7 million years ago. *Nature*, 433, 821-825.
- Hedrick, P.W. (2005). Genetics of populations. Tercera edición. Jones y Bartlett editores. Sudbury, Massachusetts. 737 pp.
- Jakobsson, M. y Rosenberg, N.A.(2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801-1806.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. y Thein, L. (1985). Hypervariable "Minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, *314*, 67-73.
- Kalinowski, S.T. (2011). The computer program STRUCTURE does not reliably identify the main genetic clusters within species: simulations and implications for human population structure. *Heredity*, *106*, 625-632.
- Keller, L.F. y Waller, D.M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution, 17*, 230-241.
- Kimura, M. y Ohta, T. (1969). The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. *Genetics*, *61*, 763-771.

- Kurata, N. y Sasaki, T. (1997). "DNA Markers: protocols, applications and overviews". Editado por Gustavo Caetano-Anollés y Peter M. Gresshoff.
 New York; Chichester: Wiley-VCH. pp 271-282.
- Levinson, G. y Gutman, G.A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, *4*, 203-21.
- Litt, M. y Luty, J.A.(1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetic, 44*, 397-401.
- Losos, J.B. (2010). A Tale of two radiations: similarities and differences in the evolutionary diversification of Darwin's finches and Greater Antillean Anolis lizards. Pp. 309-331 in P.R. Grant and B.R. Grant, Eds., In search of the Causes of Evolution. From Field Observations to Mechanisms. Princeton University Press: Princeton, NJ.
- Luikart, G. y Cornuet, J.M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, *12*, 228-237.
- MacArthur, R.H. y Wilson, E.O. (1967). The theory of Island Biogeography. *Princenton University Press*. Princenton. 203 pp.
- Machado, A. (1985). Hypothesis on the reasons for the decline of the large lizards in the Canary Islands. *Bonner Zoology Beiträge*, *36*, 563-575.
- Machado, A., López-Jurado, L.F. y Martín, A. (1985). Conservation status of reptiles in the Canary Islands. *Bonner Zoology Beiträge, 36*, 585-606.
- Marrero, A. y Francisco-Ortega, J. (2001). Evolución en islas: la metáfora espacio-tiempo-forma. In: Naturaleza de las Islas Canarias: ecología y conservación: 133-140. (J.M. Fernández-Palacios & Martín-Esquivel, Eds. Turquesa. Santa Cruz de Tenerife).
- Martín Rodríguez, E., Vázquez, J.V. y Alberto Barroso, V. (1999).
 Excavaciones arqueológicas en risco Chimirique (Tejeda, Gran Canaria).
 Primeros resultados. *Vegueta*, *4*, 57-74.
- Meco, J. (2008). Historia geológica del clima en Canarias. J.Meco (editor). Las Palmas de Gran Canaria. 296 pp.
- Mehl, K.W, y Schmincke, H.U. (1999). Structure and emplacement of the Pliocene Roque Nublo debris avalanche deposit, Gran Canaria,

Spain. Journal of volcanology and geothermal research, 94, 105-134.

- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mistmatch repair. Annual Review of Genetics, 25, 229-53.
- Morales, J., Rodríguez, A., Alberto, V., Machado, C., Criado, C. y Rando, J.C. (2009). The impact of human activities on the natural environment of the Canary Islands (Spain) during the pre-Hispanic stage (3rd-2nd Century BC to 15th Century AD): an overview. *Environmental Archaeology, 14* (1), 27-36.
- Morariu, V.I., Srinivasan, B.V.,Raykar, V.C.,Duraiswami, R. y Davis, L.S. (2008). Automatic online tuning for fast Gaussian summation. *Advances in neural information processing systems* (NIPS),1-8.
- Naranjo, J.J., Nogales, M. y Quilis, V. (1991). Sobre la presencia de *G.stehlini* en la isla de Fuerteventura (Canarias) y datos preliminares de su alimentación. *Revista Española de Herpetología*, 6, 45-48.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. (2006). GenAlx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. (2012). GenAlx6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research- an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
- Pemberton, J.M., Slate, J., Bancroft, D.R. y Barrett, J.A. (1995).Non amplifying alleles at microsatellite loci-a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, *4*, 249-52.
- Pestano, J. Y Brown, R.P. (1999).Geographical structuring of mitochondrial DNA in *Chalcides sexlineatus* within the island of Gran Canaria. *Proceedings of the Royal Society of London, B.* 266, 805-812.
- Petren, K., Grant, P.R., Grant, B.R. y Keller, L.F. (2005). Comparative landscape genetics and the adaptive radiation of Darwin's finches: the role of peripheral isolation. *Molecular Ecology*, *14*(10), 2943-2957.
- Praebel, K., Oystein Gjelland, K., Salonen, E. y Amundsen, P.A. (2013). Invasion genetics of vendace (*Coregonus albula* (L.)) in the Inari-Pasvic watercourse: revealing the origin and expansion pattern of a rapid colonization event. *Ecology and Evolution*, 3(5), 1400-1412.

- Pritchard, J.K., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000).Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*, 945-959.
- Posada, D. y Crandall, K.A. (2001). Intraspecific gene genealogies:trees grafting into networks. *Trends in ecology and evolution*, *16*, 37-45.
- Rando, J.C., Hernández, E., López, M., González, A.M.(1997). Phylogenetic relationships of the Canary Islands endemic lizard genus *Gallotia* inferred from mitochondrial DNA sequences: incorporation of a new subspecies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*,8 (1), 114-116.
- Ravelo, A.C., Andreasen, D.H., Lyle, M., Lyle, A.O. y Wara, M.W.(2004). Regional climate shifts caused by gradual global cooling in the Pliocene epoch. *Nature*, 429, 263-267.
- Rodríguez, V., Brown, R.P., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Picornell, A., Castro, J.A. y Ramon, C. (2014). Genetic diversity and historical biogeography of the Maltese wall lizard, *Podarcis filfolensis* (Squamata: Lacertidae). *Conservation Genetics*, *15*, 295-304.
- Rodriguez-González, A., Fernández Turiel, J.L., Pérez-Torrado, F.J., Hansen, H., Aulinas, M., Carracedo, J.C., Gimeno, D., Guillou, H., Paris, R. y Paterne, M. (2009). The Holocene volcanic history of Gran Canaria island : implications for volcanic hazards. *Journal of Quaternary Science*, 24(7), 697-709.
- Rosenberg, N.A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, *4*, 137-138.
- Schmincke, H.U. (1968). Pliozäne, subtropische Vegetation auf Gran Canaria. *Naturwiss 55*, 185-186.
- Schmincke, H.U y Sumita, M (1998). Volcanic evolution of Gran Canaria reconstructed from apron sediments: synthesis of vicap project drilling. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*,157, 443-469.
- Sherratt, E., Castañeda, M.R., Garwood, R.J., Mahler, D.L., Sanger, T.J., Herrel, A., de Queiroz, K. y Losos, J.B. (2015). Amber fossils demonstrate deep-time stability of Caribbean lizard communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112* (32), 9961-9966.

- Stadler, T., Kühnert, D., Bonhoeffer, S. y Drummond, A. (2013). Birth-death skyline plot reveals temporal changes of epidemic spread in hiv and hvc. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110* (1), 228-233.
- Suarez, N. M., Pestano, J. y Brown, R.P. (2014). Ecological divergence combined with ancient allopatry in lizard populations from a small volcanic island. *Molecular Ecology*, 23 (19), 4799-4812.
- Sullivan, J. y Joyce, P.(2005). Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology. Evolution and Systematics, 36*, 445-466.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology* and Evolution.30, 2725-2729.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simples sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, *17*, 6463-6471.
- Tautz, D. y Renz M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res*earch, *12*, 4127-4138.
- Tautz, D. y Schlötterer, C.(1994).Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development.4*, 832-837.
- Teacher, A.G. y Griffiths, D.J. (2011). HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular Ecology Resources, 11*, 151-153.
- Thorpe, R.S. y Baez, M. (1993). Geographic variation in scalation of the lizard *Gallotia stehlini* within the island of Gran Canaria. *Biological Journal of the Linnean Society*, *48*, 75-87.
- Van Sluys, M., Vrcibradic, D. y Rocha, C.F.D. (2002). Tail loss in the syntopic lizards *Tropidurus itambere* (Tropiduridae) and *Mabuya frenata* (Scincidae) in southeastern Brazil. *Studies in Neotropical Fauna and Environment*, 37, 227-231.
- Vernet, R., Castanet, J. y Báez, M. (1995). Comparative water flux and daily energy expenditure of lizards of the genus *Gallotia* (Lacertidae) from the Canary Islands. *Amphibia Reptilia*, *16* (1), 55-66.

Von Buch, L. (1825). Descripción física de las Islas Canarias. Berlin, 201pp.

Weber, J.L y May, P.E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics*, *44*, 388-396.

Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., *et al.*,(1985).Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26, 375-400.

Anexos

Anexo I. Autorización para toma de muestras en *Gallotia stehlini* destinadas a uso científico.



Cabildo de Gran Canaria Servicio de Medio Ambiente Calle Domingo J. Navarro, 1; 3º 35002 Las Palmas de Gran Canaria Fax 928 36 71 24 VMP/MPE/mpe

Las Palmas de Gran (Canaria, a 7 de feb	CABILDO DE GRAN CANARIA				
S/R.:	N/R.:	Serv. Medio Ambiente				
Dr. José Juan Pestano	Brito	1 8 FEB 2000				
6ª planta de la Faculta Deptarmamento de G	ad de Medicina enética	SALIDA Nº 430 Folio				
Universidad de Las P Fax 928 458653	almas de Gran Ca					

ASUNTO: Autorización para toma de muestras en lagartos destinadas a uso científico.

Con relación a su escrito, con entrada en este Servicio el cuatro de febrero del 2000, en su calidad de profesor de genética de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, con domicilio en la dirección epigrafiada, solicitando autorización para la captura, recogida de muestras por amputación del extremo de la cola 10-20 ejemplares de lagarto de la especie *Gallotia stehlini* en 25 puntos de muestros de la isla de Gran Canaria y posterior liberación, todo ello con el objetivo de realizar estudios científicos que permitan determinar la diversidad genética de la especie, debo informarle que:

1.- Este Centro Directivo tiene las competencias en la gestión de la flora y la fauna, así como la valoración de compatibilidad de los usos y actividades en los Espacios Naturales Protegidos de la isla de Gran Canaria, en cumplimiento de la Ley 12/1994, de 19 de diciembre, de Espacios Naturales de Canarias (B.O.C. núm. 157, de 24-12-94), y en aplicación del Decreto 161/1997de 11 de julio, sobre delegación de funciones de la Administración de la Comunidad Autónoma de Canarias a los Cabildos Insulares, en materia de servicios forestales y la gestión y conservación de Espacios Naturales Protegidos (B.O.C. núm. 106, de 15-8-97).

2.- Dado que la actividad redundará en un mejor conocimiento del medio natural de Gran Canaria, sin menoscabo de ninguno de sus valores, por el presente se AUTORIZA a lo solicitado, con sujeción a las siguientes condiciones.

- a) Deberán adoptarse las medidas precautorias generales que eviten los daños al medio, tales como circulación con vehículos fuera de pistas, riesgos de incendios forestales o abandono de basuras.
- Al objeto de valorar en la toma de futuras decisiones de gestión los resultados obtenidos, si procede, deberá enviarse a este Servicio copia de la publicación final de los resultados, si la hubiere.

La presente AUTORIZACIÓN tiene validez en el ámbito territorial de Gran Canaria y hasta el 31 de diciembre del presente año.



Anexo II. Median Joining Network (MJ) que representa las relaciones entre los distintos haplotipos mitocondriales. Haplotipos coloreados según el punto de muestreo al que pertenecen.



Anexo III. Minimum Spanning Network (MSN). Los círculos coloreados representan los puntos de muestreo de cada haplotipo. Los haplotipos encontrados en más de una población, están coloreados según la proporción de su presencia en cada una de ellas.



Locus 🛶	. Gat2		Gat3		Gat4		Gat5		N: tamaño
↓ Localidad	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	H _e	H _o	He	de muestra
Α	0,632	0,726	0,526	0,672	0,158	0,145	0,053	0,229	19
В	0,762	0,762	0,571	0,844	0,048	0,046	0,000	0,172	21
С	1,000	0,839	0,800	0,824	0,450	0,349	0,000	0,000	20
D	1,000	0,894	0,500	0,509	0,500	0,480	0,100	0,095	20
Е	0,800	0,821	0,550	0,784	0,450	0,349	0,050	0,049	20
F	0,900	0,888	0,700	0,799	0,200	0,180	0,200	0,180	20
G	0,913	0,874	0,739	0,698	0,217	0,258	0,000	0,000	23
Н	0,905	0,865	0,333	0,704	0,143	0,210	0,095	0,091	21
Ι	0,909	0,874	0,864	0,794	0,273	0,298	0,182	0,165	22
J	0,875	0,861	0,792	0,765	0,292	0,249	0,083	0,080	24
К	0,850	0,794	0,600	0,796	0,350	0,439	0,050	0,049	20
L	0,500	0,375	1,000	0,625	0,500	0,375	0,000	0,000	2
М	1,000	0,778	0,667	0,667	0,333	0,278	0,000	0,444	3
Ν	0,864	0,821	0,773	0,772	0,273	0,351	0,091	0,397	22
0	0,885	0,868	0,731	0,721	0,500	0,493	0,000	0,000	26
Р	0,958	0,880	0,625	0,717	0,375	0,430	0,000	0,080	24
Q	0,840	0,854	0,760	0,827	0,200	0,180	0,040	0,113	25
R	0,917	0,879	0,667	0,794	0,361	0,361	0,000	0,000	36
S	0,750	0,808	0,750	0,866	0,500	0,413	0,000	0,000	24
Т	0,857	0,816	0,821	0,804	0,143	0,133	0,000	0,000	28
U	0,750	0,818	0,600	0,789	0,150	0,139	0,100	0,095	20
V	1,000	0,611	0,000	0,444	0,000	0,000	0,000	0,000	3

Anexo IV. Heterocigosidad observada (H_o), y heterocigosidad esperada (H_e) para cada locus por punto de muestreo, junto con tamaños de muestra.