



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

**Filogeografia de la sargantana de Cabrera  
(*Podarcis lilfordi*) basat en marcadors moleculars  
(mtDNA, regió control)**

Maria Magdalena Fiol Cerdà

**Grau de Biologia**

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Bàrbara Terrasa Pont  
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
X		X	

Paraules clau del treball:

*Podarcis lilfordi*, Arxipèlag de Cabrera, ADN mitocondrial, regió control, filogeografia



## **Agraïments**

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies en especial als meus pares pel suport i paciència que han tingut durant aquests quatre anys de carrera i pel sofriment compartit tant en l'època d'exàmens com en els mesos en que he realitzat aquest treball, sé que sense ells no hagués pogut cursar els estudis universitaris.

En segon lloc, agrair als membres del departament de genètica de la UIB, tant per deixar accessible qualsevol hora el laboratori i tot el material necessari, com per l'ajuda i interès que ofereixen perquè el treball vagi bé. Sobretot a Sergio Ramírez, qui em va ajudar en les primeres passes del treball i a Marta Bassitta que sempre estava disposta a ajudar en tot moment. També agrair a la meva tutora Bàrbara, per confiar en mi a l'hora de realitzar aquest estudi, per encaminar-me en el treball i posar-me a les ordres amb la finalitat de millorar i realitzar una bona feina.

## INDEX

1. Resum/abstract .....	5
2. Introducció.....	5
2.1. Gènere Podarcis (Wagler 1830).....	6
2.1.1. Podarcis lilfordi.....	7
2.2. L'Arxipèlag de Cabrera.....	9
2.3. Marcadors genètics .....	10
2.3.1. ADN mitocondrial .....	10
2.3.2. Regió control.....	11
3. Objectius .....	12
4. Material i mètodes .....	12
4.1. Material i àrea d'estudi .....	12
4.2. Metodologia.....	14
4.2.1. Extracció i seqüenciació del DNA mitocondrial .....	14
Extracció del DNA.....	14
Purificació del DNA.....	14
Precipitació del DNA .....	14
Quantificació del DNA .....	14
Amplificació i seqüenciació del DNA mitocondrial .....	15
Comprovació del producte de PCR.....	15
Purificació del producte de PCR .....	15
Reacció de seqüenciació i seqüenciació .....	15
Edició i alienació de seqüències .....	16
4.2.2. Anàlisi estadístic .....	16
Paràmetres de diversitat.....	16
Índex de neutralitat .....	17
5. Resultats i discussió.....	18
6. Conclusions .....	22
7. Referències .....	23

## 1. Resum/abstract

### Resum

La sargantana balear (*Podarcis lilfordi*) és una espècie autòctona de les Illes Gimnèsies, catalogada segons la IUCN com una espècie en perill d'extinció per la seva reduïda mida poblacional i extinta a les illes majors de Mallorca i Menorca. El present treball pretén analitzar la variabilitat poblacional, les relacions filogenètiques i l'estructura genètica de *Podarcis lilfordi* a l'Arxipèlag de Cabrera, mitjançant l'ús de marcadors moleculars com la regió control de l'ADN mitocondrial.

Els resultats revelen la presència de tres clades dins l'arxipèlag, una relació entre la variabilitat genètica intrapoblacional i superfície de les illes i haplotips de Cabrera Gran compartits, el que dur a pensar que l'illa actués com a reservori genètic.

### Abstract

The Balearic lizard (*Podarcis lilfordi*) is a native species of the Gymnesics islands, it has been cataloged as endangered by the IUCN. Because of its small population size and almost extinct in the major islands of Mallorca and Menorca. The aim of this work is to analyze the population variability, the phylogenetic relationships and the genetic structure of *Podarcis lilfordi* to the Cabrera Archipelago, through the use of molecular markers such as the mitochondrial DNA control region.

The results reveal the presence of three clades within the archipelago, a relationship between the intrapopulation genetic variability and the surface of the islands and also it is shared haplotypes of Cabrera Gran, which suggesting that the island acted as a genetic reservoir.

## 2. Introducció

La biodiversitat del planeta s'està reduint dia a dia. En el darrer segle, s'ha arribat a assolit una taxa d'extinció de vertebrats 100 vegades superior a la taxa mitjana d'extincions que es van donar entre les cinc extincions massives ocorregudes durant la història geològica de la Terra (Ceballos et al., 2015). Moltes altres espècies han reduït considerablement la mida de la seva població a causa de la pèrdua d'hàbitat, les espècies introduïdes, la sobreexplotació i la contaminació.

És important conservar tant la biodiversitat específica com la biodiversitat genètica, ja que la pèrdua d'aquesta diversitat genètica redueix la capacitat evolutiva de les espècies i el fet de poder fer front als canvis ambientals.

Per tal de prevenir i conèixer aquesta pèrdua de biodiversitat, ha sorgit la genètica de la conservació. La genètica de la conservació, s'encarrega d'analitzar els factors genètics que causen una pèrdua de diversitat genètica, com l'endogàmia, mitjançant el maneig genètic de poblacions petites, la resolució d'incerteses taxonòmiques i unitats de maneig i la comprensió de la biologia de les espècies (Frankham, 2003).

El principal objectiu de la biologia de la conservació és protegir la diversitat biològica i els processos que l'afavoreixen fent front a les possibles perturbacions que puguin alterar negativament aquesta biodiversitat (Craig Moritz, 2002). Per aquest motiu, la biologia de la conservació té la capacitat d'assignar un caràcter distintiu a la població classificant-la com una unitat evolutivament significativa (ESU). Aquesta designació li ofereix a la població una

gestió específica i una alta prioritat de conservació. La classificació es dur a terme mitjançant dades ecològiques, genètiques, filogenètiques i moleculars.

Al llarg del temps el concepte d'ESU ha anat evolucionant fins a arribar al concepte actual. Ryder l'any 1986 va començar a definir el concepte com una unitat de població que representava una variació adaptativa significativa. Anys més tard Waples (1991) ho va definir com les poblacions reproductivament separades d'altres i amb adaptacions úniques i diferents. L'any 1994 Moritz les considerava com poblacions monofilètiques per al·lels d'ADNmt però amb diferents freqüències al·leliques en els locus nuclears (Crandall et al., 2000).

Una altra figura de conservació que es troba per davall l'ESU és la unitat de maneig (MU). Les MUs són poblacions d'individus entre els quals el grau de connectivitat és baix i per tant es poden controlar i gestionar les poblacions per separat. Aquesta figura és fonamental per la gestió a curt termini i la conservació de les poblacions naturals mitjançant la regulació dels efectes de l'activitat humana sobre l'abundància de les poblacions i espècies (Palsbøll et al., 2007).

Per tant, aquestes figures de conservació són molt importants per evitar l'extinció tant d'espècies com d'hàbitats que es troben en perill i permetre mantenir el seu potencial evolutiu.

## **2.1. Gènere *Podarcis* (Wagler 1830)**

En la família dels lacèrtids es coneixen entre 24 i 30 gèneres, entre els quals trobem *Podarcis* (Reptilia; Lacertidae). És un grup de rèptils monofilètic (Oliverio et al., 2009) i és el més divers de la família amb 19 espècies i predomina en el sud d'Europa. Les espècies d'aquest gènere es caracteritzen per la presència d'un orifici en forma de cor a l'estèrnium i a les vèrtebres autotòmiques (Arnold et al., 2007). Encara que les espècies són morfològicament similars, presenten nivells substancials de variació intraespecífica (Harris & Sá-Sousa, 2002).

*Podarcis lilfordi* habita a les illes Gimnèsies (ja extinta a Mallorca i Menorca) i *Podarcis pityusensis* es troba a les Pitiüses (Terrasa et al., 2004). Aquestes dues espècies són taxons germans que comparteixen clade amb *Podarcis tiliguerta*, present a Sardenya i Còrsega i *Podarcis filfolensis* de Malta. Totes 4 formen part del clade de les Illes del Mediterrani occidental formant un grup recíprocament monofilètic (Arnold et al., 2007; Terrasa et al., 2009a).

L'origen de la sargantana a les Balears es va donar durant el Messinià quan les illes van quedar unides amb la península Ibèrica a causa del tancament de l'estret de Gibraltar que va provocar l'aïllament de la Mar Mediterrània de l'oceà. Aquesta situació va facilitar la dispersió de fauna i flora per tota la Mediterrània dessecada. Però els moviments tectònics que es varen donar al Pliocè, van permetre la separació del continent europeu i africà permetent la transgressió marina a la Mediterrània. Com a conseqüència de la transgressió, fa uns 5 milions d'anys, les Illes Balears van quedar separades en dos donant lloc a les Pitiüses i a les Gimnèsies. Aquesta separació va donar lloc a les dues espècies endèmiques de sargantanes que trobem actualment a les Balears (Terrasa et al., 2009c).

### 2.1.1. *Podarcis lilfordi*

La sargantana balear, *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874), es troba repartida en 43 poblacions insulars (Figura 1) dels quals 16 es troben a l'arxipèlag de Cabrera (Terrasa et al., 2009a). Es va extingir a l'illa de Mallorca i Menorca per la presència de depredadors com les genetes (*Genetta geneta*) o moixos (*Felis silvestris*) entre altres, i per les pertorbacions humanes. Però, l'absència de depredadors en els illots no impedeix que la mida poblacional en alguns d'ells sigui extremadament petita, assolint rangs des de 1000 fins a menys de 50 individus, motiu pel qual es considera que aquesta espècie es troba en perill d'extinció per la IUCN i és una espècie en règim d'especial protecció a nivell autonòmic. A la reduïda mida de la població se li sumen altres motius com l'alta fragmentació de la seva distribució i una reduïda extensió de l'àrea d'ocupació (Pérez-Mellado et al., 2008).



**Figura 1:** Mapa de les àrees de distribució actuals de *P. lilfordi* a les Balears. Predomina als illots del voltant de Mallorca i Menorca i a l'arxipèlag de Cabrera.

Entre les poblacions hi ha una gran variació de mida, dimorfisme sexual, nombre d'escames dorsals i coloració dels individus (Salvador, 2009). A més, presenten característiques ecològiques pròpies, com a conseqüència dels microambients aïllats que es donen a cada illa o illot. Per aquest motiu, s'han pogut descriure 28 subespècies basant-se en la diversitat morfològica observada, ja que aquestes no formen unitats genèticament distintes, el que significa que les adaptacions morfològiques de les diferents subespècies són relativament molt recents (Terrasa et al., 2004; Terrasa et al., 2009c).

Morfològicament és de constitució robusta amb un morro molt punxegut. Els mascles són de longitud major gràcies al dimorfisme sexual que presenten, 81 mm enfront de 75 mm de les femelles que a més també mostren un nombre inferior d'escames dorsals. A l'illa de Cabrera es dona una varietat en la coloració associada amb l'edat dels individus. Els mascles adults són més obscurs, mentre que les femelles presenten una coloració pareguda als juvenils.

Presenten una alimentació omnívora, la seva dieta varia segons l'època de l'any responent als canvis de la disponibilitat de l'aliment. De la dieta animal destaquen les formigues o

homòpters, i de la part vegetal es poden alimentar tant de fulles, flors, nèctar, pol·len i fruits de nombroses plantes. Poden detectar alguns components tòxics de les plantes per evitar el seu consum.

Es reproduïxen des de febrer fins al començament de l'estiu. Posen una mitja de 2,5 ous amb una taxa de naixement del 79%, entre una i tres vegades a l'any (Salvador, 2009).



**Figura 2:** Exempler de *Podarcis lilfordi*. Font: (Terrasa et al., 2009c)

La variabilitat genètica depèn de la mida de la població. En les poblacions grans la variabilitat és major que en les poblacions petites (Pérez-Mellado et al., 2008). En canvi, la variabilitat genètica de les illes de l'Arxipèlag de Cabrera és elevada, possiblement com a causa de les repetides colonitzacions per part de les poblacions continentals a aquestes illes (Harris & Sá-Sousa, 2002; Terrasa et al., 2004).

Les tècniques d'amplificació i seqüenciació del DNA mitocondrial han permès conèixer la variabilitat nucleotídica dels diferents individus. Amb aquests anàlisis s'han pogut establir relacions filogenètiques consistents permetent diferenciar les poblacions de *P. lilfordi* en quatre grans grups. A més, les xarxes filogenètiques suggereixen que el gènere *Podarcis* forma un clade monofilètic, en canvi les subespècies de *P. lilfordi* no formen un grup monofilètic en totes les illes, per exemple a Cabrera, les subpoblacions són parafiletiques. (Oliverio et al., 2009; Terrasa et al., 2004).

El primer grup està format per les 16 poblacions insulars de Menorca, i es va originar al final del Pliocè fa uns 2,6 Ma com a resultat de l'augment del nivell del mar.

El segon, el grup format per les poblacions de l'oest de Mallorca originat a finals del Pliocè i inicis del Plistocè entorn a uns 2 Ma, a causa de la topografia abrupta i empinada dels illots.

Els dos darrers grups es van diferenciar durant el Plistocè fa aproximadament 1,2 Ma.

El tercer grup està format per les poblacions del nord-est i sud de Mallorca juntament amb les illes del nord de l'arxipèlag de Cabrera que van actuar de refugi de poblacions de Mallorca en èpoques desfavorables i en les que posteriorment es va donar una migració en direcció oposada al refugi.

El darrer i quart grup està compost per dos subgrups, un compost per les poblacions de Cabrera Gran i les illes dels voltants i el grup més petit format per tres illes del sud de l'arxipèlag: Estel Xapat, Estel de Fora i Esclata-sang (Brown et al., 2008; Terrasa et al., 2009a).



La majoria d'aquests esdeveniments de cladogènesis es varen donar quan els nivells de la mar eren alts, el que suggereix que hi va haver una sèrie de colonitzacions transmarines i una baixa introgressió d'ADNmt entre les poblacions durant els períodes posteriors en què les illes quedaren unides (Brown et al., 2008; Terrasa et al., 2009a).

El flux genètic actualment és asimètric des del sud de Cabrera al nord de Mallorca com a resultat de que Cabrera Gran actués com a refugi en èpoques desfavorables. Entre les illes properes de Cabrera Gran i aquesta, el flux es troba molt restringit per la profunditat del mar que suposa l'aïllament de les poblacions. En canvi, entre les illes del sud, la poca profunditat permet un flux genètic casi simètric (Terrasa et al., 2009a).

La determinació de quatre grups filogenètics determinen que al menys s'han de reconèixer quatre ESUs per conservar les poblacions que presenten una història maternal única, sobretot les poblacions del Toro i el Colomer que presenten haplotips ancestrals exclusius d'aquestes illes (Terrasa et al., 2009c).

## 2.2. L'Arxipèlag de Cabrera

L'Arxipèlag de Cabrera es troba a 9 km al sud de Mallorca. Està format per l'illa principal anomenada Cabrera o Cabrera gran i 18 illes menors orientades de nord-est a sud-oest. Encara que es trobi a tan sols 9 km des de l'illa més propera de l'arxipèlag (l'illa de Na Foradada) al cap de Ses Salines, pertany administrativament al terme de Palma i va ser declarat Parc Nacional l'abril de 1991 (Servera, 1993).

L'illa més propera a Mallorca és Sa Foradada, seguida de Na Pobra, Na Plana, N'Esponja, Sa Conillera i Na Redona. Al voltant de Cabrera Gran es pot trobar Ses Rates, Fonoll, Ses Bledes i Imperial. Al sud de Cabrera Gran trobem un conjunt d'illes anomenades els Estels, compost per l'Estel Esclata-sang, l'Estel Xapat, l'Estel des Coll i l'Estel de Fora.

L'arxipèlag presenta una extensió de 18,36 km<sup>2</sup> dels quals 11,54 pertanyen a Cabrera Gran. Tot l'arxipèlag es caracteritza per tenir una costa abrupta amb penya-segats que hi dificulten l'accessibilitat. Per la seva part, l'illa de Cabrera Gran presenta una gran varietat. La costa irregular alterna platges, costa baixa i penya-segats que poden superar els 50m d'alçària. El punt més elevat és el puig de Na Picamosques amb 172 metres. Les altres illes tenen una alçada molt variada, la segona illa amb més extensió és Sa Conillera amb penya-segats de fins a 122 m (Servera, 1993).

L'època post-messiniana, es va caracteritzar per ser una època de glaciacions. L'arxipèlag es va veure afectat sobretot per les glaciacions del Pleistocè del Riss i del Würm. Les pujades i baixades del nivell de la mar durant aquesta època de glaciacions va ser clau per la biogeografia actual de Cabrera, ja que en les etapes interglacials només quedaven els pics elevats emergits i durant les glaciacions les illes quedaven comunicades entre si (Terrasa et al., 2009c; Servera, 1993).

A l'Arxipèlag de Cabrera es troben dos tipus de fauna, la fauna autòctona com les rates-pinyades o i l'al·lòctona com els eriçons. Durant la història s'han extingit un gran nombre d'animals a l'arxipèlag. En el cas dels rèptils, *Podarcis lilfordi* és l'únic supervivent autòcton juntament amb dues espècies de dragons al·lòctons com són *Hemidactylus turcicus* i *Tarentola mauritanica* d'aquesta classe. Pel que fa a la flora, Servera al 1993 citava 496 espècies de plantes entre Cabrera Gran i la resta d'illots (Servera, 1993).

### **2.3. Marcadors genètics**

La biologia molecular proporciona eines utilitzades en la investigació evolutiva, ecològica i taxonòmica per respondre a una gran varietat de qüestions.

La majoria de vegades, la variació d'ADN es mesura amb sistemes de marcadors genètics moleculars que ens permeten seqüenciar el genoma complet per fer estudis de diversitat, d'associació, selecció i mapejar trets genètics (Duran et al., 2009). La capacitat d'utilitzar la variació d'ADN de seqüència per la reconstrucció de la filogènia, s'ha disparat en la darrera dècada amb l'arribada de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

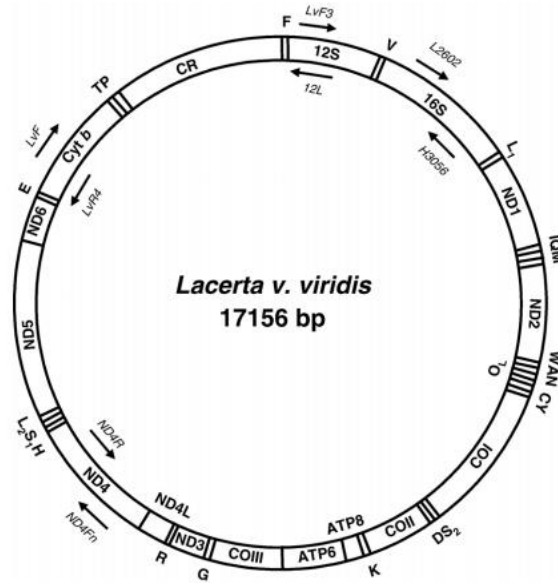
A l'hora de determinar relacions filogenètiques entre poblacions, espècies i subespècies, destaca l'ús del DNA mitocondrial per les seves propietats moleculars, com presentar un embalatge genètic compacte, per la manca de recombinació, per la gran evolució que sofreix en comparació amb les seqüències nuclears, per la gran quantitat de còpies presents en una sola cèl·lula i per ser només d'herència materna (Hewitt, 2001; Pereira, 2000).

#### **2.3.1. ADN mitocondrial**

L'ADN mitocondrial és una molècula circular tancada que conté un genoma petit extracromosomal d'aproximadament unes 16-19 kb amb 13 gens codificants per proteïnes, 22 tRNAs, 2 rRNAs i un regió major no codificant coneguda com a regió control (Böhme et al., 2007). La replicació d'aquesta molècula de doble cadena es produeix de forma asimètrica tant per la cadena pesada com per la lleugera a partir de dos orígens de replicació independents (OH, OL). Aquest fet juntament amb l'impacte d'un entorn altament reactiu dins els orgànuls són la principal causa de l'alta taxa de mutació del DNA mitocondrial (Böhme et al., 2007). Aquestes mutacions solen ser neutrals o nocives. Si es produeix un canvi nociu, la selecció de purificació s'encarrega d'eliminar la mutació. Per aquest motiu, la variació en el DNAm es deu a processos neutrals (Galtier et al., 2009).

Tots els genomes mitocondrials contenen els mateixos 37 gens que, juntament amb ARN i proteïnes citosòliques, sintetitzen els components que formen les mitòcondries juntament amb sistemes propis pel seu correcte desenvolupament i funcionament. La regió control conté elements de control per a la replicació i transcripció (Boore, 1999). Aquesta regió és utilitzada en estudis poblacionals deguts a l'alta variabilitat nucleotídica que presenta. En canvi, gens codificants per proteïnes com el citocrom b, es sol utilitzar per fer anàlisis filogenètics a nivell d'espècie (Pereira, 2000).

El DNAm és idoni per realitzar estudis filogenètics al presentar, tant en vertebrats com en invertebrats, un contingut genòmic, una arquitectura genòmica i una asimetria de les cadenes dels gens casi invariable. A més, l'alta variabilitat nucleotídica que presenten les poblacions naturals a causa de la seva elevada taxa de mutació, serveix com indicador de la història de la població a curt termini (Galtier et al., 2009; Gissi et al., 2008).



**Figura 3:** Organització del genoma mitocondrial de *Lacerta viridis viridis* (Reptilia: Lacertidae) (Böhme et al., 2007).

### 2.3.2. Regió control

La regió no codificadora es caracteritza per presentar una seqüència repetida en tàndem de 35 pb en la terminació 5' amb una composició superior de cisteïna i una disminució d'adenina en comparació amb la resta de la regió control (Böhme et al., 2007). S'estén entre els gens que codifiquen per el tRNA de la fenilalanina (*tRNAPhe*) i el tRNA de la prolina (*tRNAPro*).

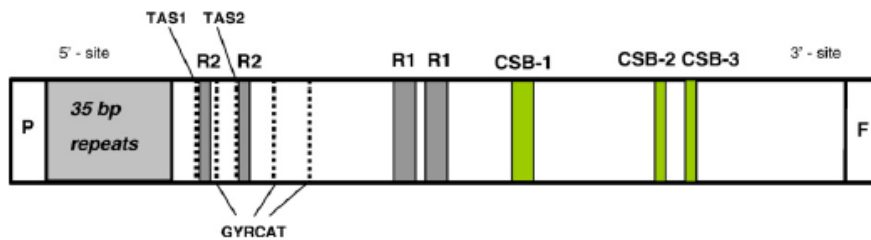
El fet de que aquesta regió no presenti elements de correcció, fa que s'acumulin substitucions de bases, indels i s'originin les repeticions en tàndem responsables de la variació en el longitud en les molècules de ADN mitocondrial. En el lacètid *Lacerta viridis viridis*, el nombre de repeticions varia entre 6 i 10, causant una longitud de la regió control que compren des de 1680 a 1820 pb respectivament (Böhme et al., 2007; Brehm et al., 2003a).

La RC és la regió del genoma que evoluciona més aviat per aquesta raó és molt utilitzada per realitzar estudis de filogenètica intra e interespecífica. (Brehm et al., 2003a).

La composició de bases per *Lacerta viridis viridis* és de: 30,2 % A, 22,7% C, 35,8% T, 11,2% G. Aquesta composició és molt semblant a la de *Lacerta dugesii* i altres vertebrats (Böhme et al., 2007).

L'organització estructural de la regió control és molt semblant en tots els organismes i està dividida en tres dominis:

- Domini de seqüències associades a terminació estesa (ETAS): es troba entre la posició 350 i 650, a l'extrem 5' i adjacent al *tRNAPro*. S'hi identifiquen fragments associats amb seqüències de terminació (TAS) o motius reguladors com "GYRCAT".
- Domini central: domini molt conservat flaquejat per dues zones repetitives (R1 i R2).
- Domini de blocs de seqüència conservats (CSB): es troba a l'extrem 3' adjacent al *tRNAPhe*. Conté els elements reguladors: l'origen de replicació OH i dos promotors (HSP i LSP). Presenta estructures termodinàmicament estables amb blocs de seqüències curtes conservades anomenades CSB1, CSB2 i CSB3 que actuen com a senyals reguladores pel processament dels cebadors d'ARN per la replicació de la cadena pesada (Böhme et al., 2007; Sbisà et al., 1997).



**Figura 4:** Regió control de *Lacerta viridis* (Böhme et al., 2007).

### 3. Objectius

Les illes presenten uns microambients que afavoreixen la biodiversitat, i a més les Illes Balears, i concretament l'Arxipèlag de Cabrera, ofereixen un escenari per realitzar i establir relacions filogenètiques. A més, *Podarcis lilfordi* presenta una alta variació genètica intraespecífica. A Terrasa et al (2009a) s'ha observat, a partir també de DNAm, però amb un nombre limitat de mostres, la presència de dos clades de sargantanes amb l'existència d'un flux genètic entre ells.

L'objectiu general és analitzar la variabilitat i l'estructura genètica de l'espècie *Podarcis lilfordi* a l'Arxipèlag de Cabrera emprant com a marcador la regió control del DNA mitocondrial.

Per tant, els objectius específics són:

- Determinar la variabilitat intra i inter poblacional de *Podarcis lilfordi*.
- Conèixer les relacions filogeogràfiques de Cabrera Gran amb la resta d'illes de l'arxipèlag.
- Establir l'estructura genètica de *Podarcis lilfordi* a l'Arxipèlag de Cabrera.

### 4. Material i mètodes

#### 4.1. Material i àrea d'estudi

S'han analitzat 93 individus de *P. lilfordi* obtinguts mitjançant la captura amb tècniques no invasives i la seva posterior alliberació al mateix lloc de recollida. Les mostres emprades s'obtingueren a partir de la coa dels diferents individus i es varen conservar dins tubs amb etanol absolut a 4°C.



**Figura 5:** Localització geogràfica de les poblacions de *P. lilfordi* mostrejades.

Sigla	Illot (localitat)	Nº individus
Cp	Cabrera Gran-Port	10
Cf	Cabrera Gran-Far de n'Enciola	6
Cm	Cabrera Gran-Miranda	9
Fo	Sa Foradada	5
Po	Na Pobra	4
Pl	Na Plana	5
Co	Sa Conillera	4
Ej	N'Esponja	3
Rd	Na Redona	5
Rt	Ses Rates	4
I	N'Imperial	5
B	Ses Bledes	5
Fl	Fonoll	9
Et	Esclata-sang	5
X	Estel Xapat	5
Xc	Estel Xapat-Carabassot	2
Ec	Estel des Coll	4
Ef	Estel de Fora	3

**Taula 1:** Correspondència entre les sigles i els illots (localitats) juntament amb els individus mostrejats a cada lloc.

## **4.2. Metodologia**

### **4.2.1. Extracció i seqüenciació del DNA mitocondrial**

#### **Extracció del DNA**

Per l'extracció de DNA a partir de mostres de coes es va seguir el protocol de Terrasa et al. 2009a.

Abans d'iniciar la lisi dels fragments de coa i amb la finalitat d'hidratar-los, es mantingueren una hora en aigua destil·lada. A continuació, es tallaren en petits segments, s'hi afegir el tampó de lisi (Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0.45% Igepal CA-630, 0,45% Tween-20) i s'homogeneïtzà amb l'ajuda d'un homogeneitzador (Tissue Master 125). Els detergents del tampó de lisi faciliten la ruptura de la membrana lipídica provocant l'alliberació del DNA de dins la cèl·lula.

Després de l'homogeneïtzació dels fragments de coa s'afegiren el detergent dodecil sulfat sòdic (SDS) al 10% i la proteïnasa K que degrada i desnatura les proteïnes respectivament. Es deixaren els tubs tot el vespre a 37°C al bany per accelerar la reacció anterior.

#### **Purificació del DNA**

Per eliminar les restes cel·lulars es va seguir el mètode estàndard de fenol-cloroform. El fenol actua com nucleases eliminant les proteïnes i el cloroform els residus lipídics. S'afegiren en primer lloc 4 ml de fenol a cada mostra, al decantar el sobrenedant s'afegiren 2 ml de fenol i 2 ml de cloroform i novament al decantar el sobrenedant se li afegiren 4 ml de cloroform. Després d'introduir cada reactiu es centrifugaren les mostres durant 10 minuts a 3000 rpm.

#### **Precipitació del DNA**

La precipitació de les mostres es dugué a terme mitjançant una incubació a -20°C amb etanol absolut en fred i NaCl 5M. A continuació, es centrifugà 10 minuts a 4000 rpm amb etanol al 70% per eliminar les sals. Després de decantar la fase líquida i eixugar durant una hora a la bomba de buit, s'obtingué el precipitat de DNA que es ressuspenugué amb H<sub>2</sub>O mili-Q per poder quantificar la concentració de DNA.

#### **Quantificació del DNA**

Per quantificar les mostres, es va utilitzar un espectrofotòmetre (NanoVue™). Si les concentracions foren molt elevades, es diluïren amb H<sub>2</sub>O mili-Q per obtenir concentracions d'ADN a 80ng/μl, valor òptim per fer la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

## Amplificació i seqüenciació del DNA mitocondrial

Per l'amplificació de les mostres es segueixen les tècniques de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). A cada tub es va posar: 17,7 µl d'H<sub>2</sub>O mili-Q, 2,5 µl de Tampó 10X, 1,75 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl del primer corresponent, 1 µl de dNTP i 0,05 µl de Taq polimerasa.

Dins cada tub de microcentrifuga s'afegiren 24 µl d'aquesta mescla i 1 µl de DNA, si en la quantificació alguna mostra donà uns valors inferiors a 80 ng/µl, es posaren 2 µl de DNA i 23 µl de mescla. Es preparà un control positiu prèviament estudiat i un control negatiu per cada amplificació realitzada.

### Primers

**12L4** (Terrasa et al., 2009)      5'-TACCCTTGCTCATAGCATAACTG-3'

**12H3** (Terrasa et al., 2009)      5'-GTCTTGTTGACTGTAATTAACCGATA-3'

### Condicions termociclador

Temperatura	Temps (min)	
96°C	5:00	30 cicles
94°C	1:00	
50°C	1:00	
72°C	2:00	
72°C	5:00	
4°C	∞	

## Comprovació del producte de PCR

Es preparà un gel d'agarosa a l'1% amb bromur d'etidi per comprovar la qualitat d'amplificació a partir del producte de la PCR i tampó de càrrega (40% de sacarosa i 0,25% de blau de bromofenol).

## Purificació del producte de PCR

Al comprovar amb un transiluminador que no hi havia contaminació de les mostres en el control negatiu i que la qualitat era la indicada, les mostres es van purificar amb el kit comercial Smarter Nucleic Acid Sample Preparation (Stratagene molecular), el qual sotmet les mostres a distints tampons per eliminar enzims, sals i els productes d'amplificació.

## Reacció de seqüenciació i seqüenciació

Per la seqüenciació de les mostres es necessitava una concentració d'uns 20ng/µl de DNA per mostra, concentració adequada per realitzar el marcatge corresponent a la llargària de la regió control (500pb). Per saber a quina concentració estaven les nostres mostres, abans de seqüenciar es va quantificar el producte purificat. Si era necessari es diluïren les mostres.

Per la reacció de seqüenciació, es varen utilitzar: 0,2 µl del primer corresponent; 7 µl de H<sub>2</sub>O mili-Q, 1,2 µl de Big Dye i 0,6 µl de tampó 10x i 1 µl de DNA purificat.

Condiciones termociclador		
Temperatura	Temps (min)	
94°C	3:00	35 cicles
96°C	0:10	
50°C	0:05	
60°C	4:00	
4°C	∞	

Abans de dur al seqüenciador es va precipitar el producte de PCR, per això s'afegiren a tot el producte del termociclador etanol absolut i NaAc. El resultat, es va centrifugar a màxima velocitat. Posteriorment, després de llevar tot el sobrenedant, afegir etanol i repetir la centrifuga, es va eixugar el precipitat a temperatura ambient tota la nit.

Abans de seqüenciar, d'afegiren 20 µl d'H<sub>2</sub>O mili-Q.

La seqüenciació es va realitzar amb el seqüenciador 3130 *Applied Biosystems*® en el que l'ADN es desnatura per calor i les cadenes es sotmeten a una electroforesi capil·lar en un gel de poliacrilamida on es separen els nucleòtids. D'aquesta manera les cadenes es separen segons la seva mida. A més, les cadenes són irradiades per làser amb el qual els nucleòtids terminals marcats poden ser detectats gràcies a la fluorescència que emeten. Finalment, el seqüenciador interpreta l'ordre i posició de les emissions i obté la seqüència en forma de gràfic.

### Edició i alienació de seqüències

Les seqüències obtingudes es varen editar i alinear amb el software BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999). Amb els cromatogrames es varen comprovar cada una de les seqüències, tant les cadenes H i L. Es varen comparar les dues seqüències per obtenir una seqüència única. Una vegada es varen obtenir totes les seqüències úniques, es varen alinear i tallar per obtenir fragments de la mateixa longitud.

## 4.2.2. Anàlisi estadístic

### Paràmetres de diversitat

Els paràmetres de diversitats estudiats es varen calcular amb els software DnaSP6 (Librado i Rozas, 2009) i MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016):

- Els Indels són llocs en els que s'ha produït una inserció o una deleció d'una base nitrogenada.
- S: nombre de posicions variables o nombre de posicions nucleotídiques on hi ha un polimorfisme i la seva distribució en els codons.
- Ts: nombre de transicions.
- Tv: nombre de transversions.
- A+T: composició nucleotídica de les mostres segons la proporció d'Adenina i Timina presents.
- H: nombre d'haplotips, cada un dels patrons de variabilitat nucleotídica.



- Hd: diversitat haplotípica, probabilitat de que dues mostres a l'atzar contenguin haplotips diferents.

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

La diversitat haplotípica ve determinada per l'anterior fórmula on la  $n$  es refereix al nombre de mostres, la  $k$  al nombre d'haplotips i la  $p_i$  a la freqüència relativa de l'haplotip  $i$ .

- $\pi$ : diversitat nucleotídica, nombre mitjà de diferències nucleotídiques per lloc entre dues mostres de DNA a l'atzar.

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$$

La diversitat nucleotídica ve determinada per l'anterior fórmula on  $n$  es refereix al nombre de mostres,  $p_i$  i  $p_j$  a la freqüència de les seqüències  $i$  i  $j$  respectivament i  $\pi_{ij}$  la proporció de nucleòtids que difereixen al comparar les dues seqüències  $i$  i  $j$ .

- K: nombre mitjà de diferències entre dues seqüències.

## Índex de neutralitat

Els índex de neutralitat s'han calculat mitjançant el software DnaSP6 (Librado i Rozas, 2009). Els tests de neutralitat ens permeten comprovar si les mostres han estat sotmeses a un procés d'evolució neutra o a algun tipus de pressió selectiva:

- D de Tajima (Tajima, 1989), relaciona el nombre mitjà de diferències entre dues seqüències de DNA i el nombre total de mutacions observades baix condicions de neutralitat o properes a la neutralitat:

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V}}$$

La theta ( $\theta$ ) indica el valor esperat i es calcula mitjançant el nombre de llocs segregants ( $S$ ) i el nombre total de mostres,  $\pi$  és la diversitat nucleotídica trobada i  $V$  la variança de  $\pi$ .

- Si la D és igual a 0, ens trobam davant una situació d'equilibri neutral.
  - Si la D és positiva significa que existeix una major variabilitat de la esperada. Aquesta situació es dona quan hi ha varis al·lells que es troben davant una selecció positiva, una reducció poblacional o una selecció equilibradora.
  - Si la D és negativa, hi ha una menor variabilitat de la esperada. En aquest cas això es pot deure a una expansió poblacional, a la presència de mutacions deletèries o a una selecció purificadora.
- $F_s$  de Fu (Fu i Li, 1993) compara el nombre de mutacions observades amb el nombre de mutacions esperades baix certes condicions de neutralitat usant dades sobre la distribució haplotípica, el que permet discriminar entre una expansió recent o una deriva gènica.

$$F_s = \text{Ln} \left( \frac{S'}{1-S'} \right)$$

$S'$  és la probabilitat d'observar, de forma aleatòria, una mostra amb un nombre d'haplotips igual o menor al nombre observat baix el nivell de diversitat observada i baix el criteri de que tots els haplotips són selectivament neutrals.

Un valor de  $F_s$  negatiu vol dir que s'ha donat una expansió demogràfica després d'haver-se sotmès a un coll de botella o a una selecció sobredominant i que per tant hi ha un excés d'al·lels. En canvi, un valor positiu indica una pèrdua d'hàbitat o una selecció positiva el que s'evidencia amb un dèficit d'al·lels (Perfectti et al., 2009).

Per tal d'analitzar l'estructura poblacional de l'arxipèlag es va realitzar una xarxa haplotípica amb el programa TCS 1.21 (Clement et al., 2000) on els haplotips s'agrupen segons la seva abundància i un arbre filogenètic de màxima verosimilitud amb el software MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). El nivell de confiança de cada nòdul es va estimar mitjançant el mètode Bootstrap.

## 5. Resultats i discussió

Una vegada editades les seqüències amplificades, s'han obtingut fragments de 455 pb.

No es troben delecions ni insercions per cap dels 93 fragments ja que la seva influència en poblacions intraespecífiques és petita (Pearce, 2006). S'han observat 25 llocs polimòrfics, la majoria es troben a l'illa de Cabrera Gran i a Na Plana amb 9 i 7 llocs polimòrfics respectivament. Aquests llocs polimòrfics, corresponen a 16 transicions i 9 transversions. En l'ADN mitocondrial de vertebrats és comú trobar un elevat nombre de transicions en front a les transversions i més si són seqüències que es troben estretament relacionades (Moritz et al., 1987). En l'article de Terrasa (2009a) tampoc es troben indels en la regió control i destaquen més les transicions que les transversions a causa de la proximitat dels individus; com més propers són els individus estudiats més transicions es troben, en canvi a nivell d'ordre destaquen les transversions (Avice et al., 1987).

No s'observa una gran variació entre el contingut d'adenina i timina dins les diferents poblacions. En l'arxipèlag el percentatge és de 69,75% de A+T en front a 30,25% de G+C. El valor de A+T és superior al contingut total d'aquestes bases en el DNA mitocondrial d'altres vertebrats que és de tan sols el 59,7% (Böhme et al., 2007), però si es compara amb el contingut de la regió control d'altres espècies de lacèrtids com *Lacerta viridis*, el biaix no és molt elevat. Les petites diferències poden ser degudes al ràpid canvi evolutiu que pateix aquesta regió al no codificar per proteïnes i a la pressió de mutació direccional que sofreixen els gens, en el nostre estudi a favor de l'adenina (Böhme et al., 2007; Jermiin et al., 1994).

Hi ha un total de 15 haplotips en l'arxipèlag. L'illa de Cabrera Gran presenta un major nombre d'haplotips (nou) que la resta d'illes, el nombre d'haplotips correspon al llocs polimòrfics trobats. Es troben nou illes monomòrfiques (Na Foradada, Na Pobra, N'Esponja, Na Redona, Ses Rates, Ses Bledes, Imperial, Estel Xapat i Estel de Fora) la majoria corresponen a les illes del nord de l'arxipèlag.

En general, l'arxipèlag presenta una variabilitat nucleotídica de 0,00558, un valor de K de 2,54 i una variabilitat haplotípica alta (0,829), ja identificada a altres estudis. La causa de l'alta variabilitat possiblement es deu a les contínues colonitzacions a les illes per part de poblacions ja extintes procedents de Mallorca (Terrasa et al., 2009a; Terrasa et al., 2004). Les illes que presenten la diversitat haplotípica més alta correspon a l'illa de Sa Conillera (0,833), seguit de Cabrera Gran (0,79) i Na Plana (0,7). A més, són també les illes que

presenten una major diversitat nucleotídica: Na Plana (0,00703), seguit de Cabrera Gran (0,00418) i Sa Conillera (0,00366). Per altra banda, l'illa de Na Plana és la que presenta un major nombre de diferències entre dues seqüències amb un valor de 3,2. La segona illa amb major nombre de diferències és l'illa de Carabassot amb un valor de 2. Novament, Cabrera Gran i Sa Conillera es troben entre les illes amb valors més elevats amb una mitja de 1,9 i 1,667, respectivament.

Cal destacar que les tres illes que presenten una major variabilitat genètica (Cabrera Gran, Sa Conillera i Na Plana) són les tres illes de major superfície. Aquesta relació assegura la conservació de la població segon Pérez-Mellado et al. (2008), que detecta una clara relació entre la densitat de la població de *P. lilfordi* i l'àrea de les illes i entre la mida poblacional i la variabilitat genètica.

Els tests de neutralitat, tant la D de Tajima com el test Fs de Fu, presenten resultats no significatius en tots els valors. Pel test de la D de Tajima, en tots els casos menys a l'illa de Sa Conillera i Fonoll mostren valors negatius. En canvi, pel test Fs de Fu, tots els valors són positius a excepció de Cabrera Gran i Sa Conillera. Si s'analitza l'arxipèlag en general els dos test donen valors negatius no significatius. Les illes de N'Esponja, Carabassot i Estel de fora; no s'han pogut calcular els valors dels tests per la manca en el nombre de mostres, aquests tests requereix un mínim de quatre mostres per fer els càlculs.

Els tests de neutralitat suggereixen que a l'arxipèlag s'ha produït un excés de mutacions i una expansió de la mida poblacional, associat amb l'alt nivell de variabilitat genètica (Pérez-Mellado et al., 2008). En canvi, els illots més petits presenten una diversitat genètica inferior a causa d'un possible coll de botella o per una colonització transmarina (Terrasa et al., 2010).

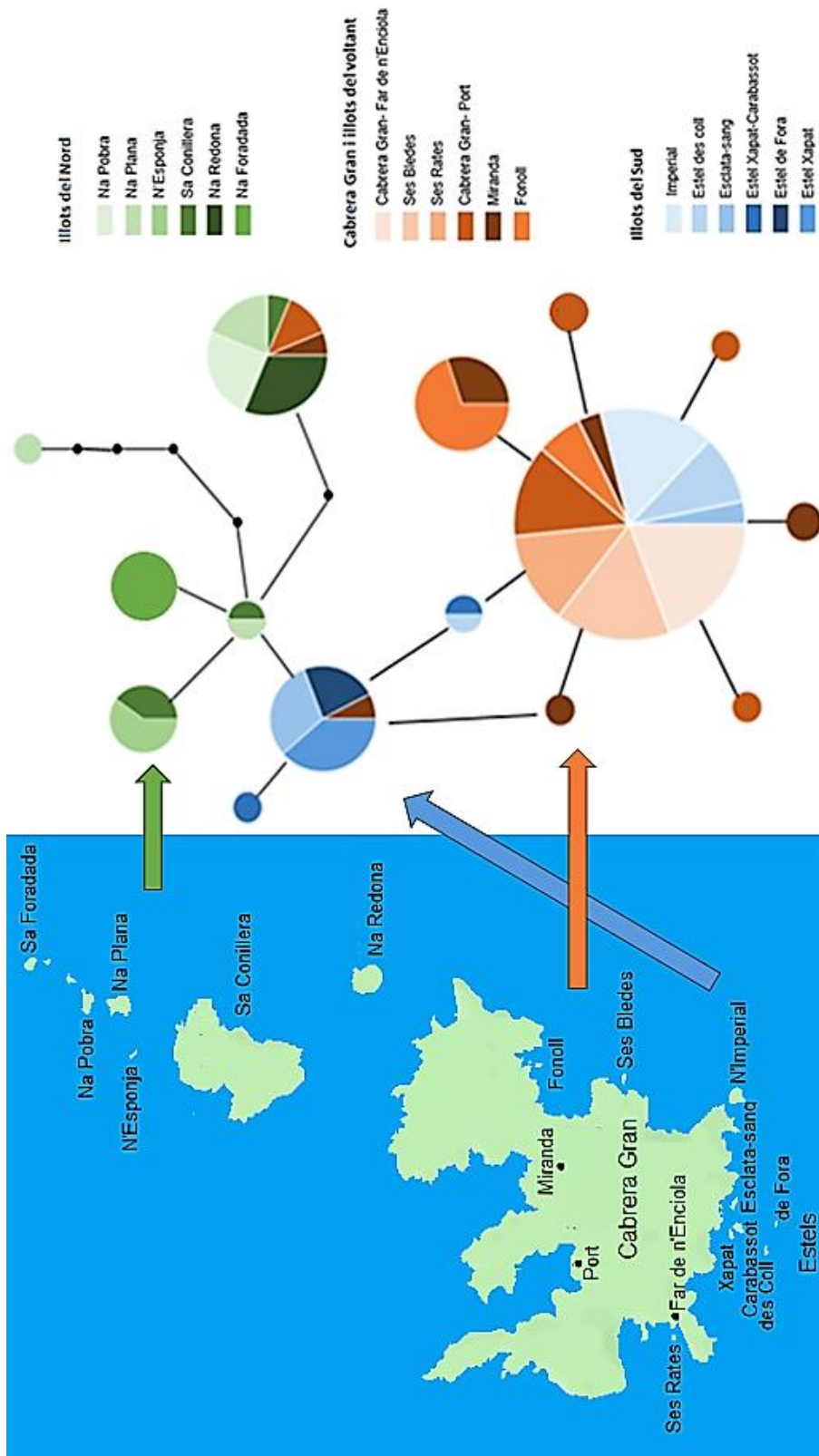
El mapa haplotípic mostra una certa relació entre la distribució haplotípica de l'espècie i la distribució biogeogràfica de l'arxipèlag (Figura 6). Es caracteritza per la presència d'un sistema radial amb un haplotip central molt nombrós format per individus principalment de Cabrera Gran i voltants, i dos més considerablement també nombrosos, un amb individus del nord i l'altre amb individus del sud de l'arxipèlag, dels quals sorgeixen una sèrie d'haplotips individuals d'un sol canvi mutacional.

A les illes del nord es troben haplotips buits, el que podria significar que es va donar un coll de botella, possiblement com a causa dels moviments del nivell de la mar durant les glaciacions (Pérez-Mellado et al., 2008; Terrasa et al., 2009a).

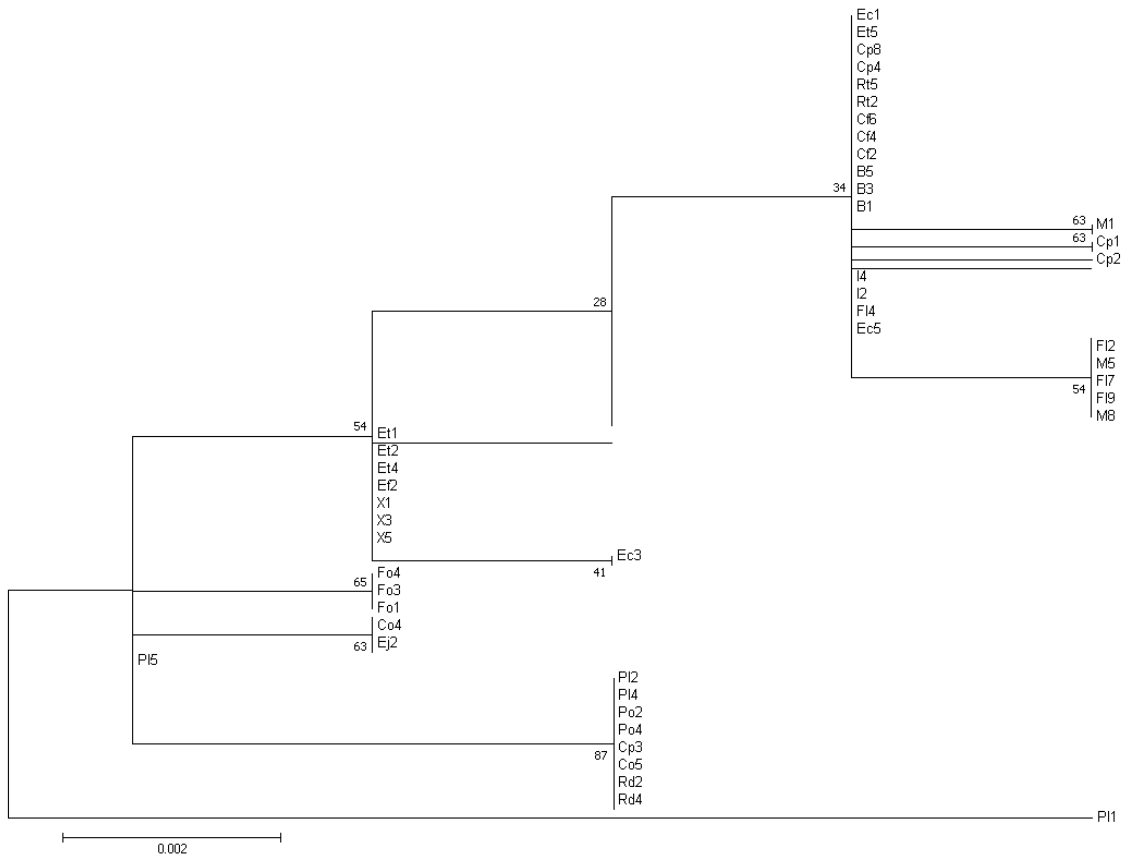
Les diferents àrees geogràfiques i els passos mutacionals confirmen la presència de tres agrupacions; les illes del nord es corresponen a una agrupació, les del sud a una altra agrupació i Cabrera Gran i les illes del seu voltant a un altre grup; ja reconegudes per altres estudis, dins l'Arxipèlag de Cabrera a causa de la fragmentació al·lopàtrica. Miranda i Fonoll actuen com a lloc d'intersecció entre dos dels grups, al presentar individus que comparteixen haplotip tant amb les illes del nord com amb les del sud. Aquest fet es pot explicar per la possible actuació de Cabrera Gran com a refugi durant èpoques desfavorables en les quals, els illots quedaven submergits per la mar (Brown et al., 2008; Terrasa et al., 2009a).

Localització	N	Indel	S	Ts	Tv	A+T	H	Hd	$\pi$	K	D	Fs
Cabrera	25	NO	9	5	4	0,699	9	0,79 ( $\pm 0,074$ )	0,00418 ( $\pm 0,0009$ )	1,9	-0,658 <sup>NS</sup>	-2,847 <sup>NS</sup>
Gran	10											
Port	6											
Far de n'Enciola	9											
Na	5	NO	0	0	0	0,697	1	0	0	0	0	0
Miranda	4	NO	0	0	0	0,692	1	0	0	0	0	0
Foradada	5	NO	7	3	4	0,694	3	0,7 ( $\pm 0,218$ )	0,00703 ( $\pm 0,0030$ )	3,2	-0,332 <sup>NS</sup>	1,458 <sup>NS</sup>
Na Pobra	4	NO	3	2	1	0,695	3	0,833 ( $\pm 0,222$ )	0,00366 ( $\pm 0,0013$ )	1,667	0,168 <sup>NS</sup>	-0,133 <sup>NS</sup>
Na Plana	3	NO	0	0	0	0,697	1	0	0	0	0	0
Sa	5	NO	0	0	0	0,692	1	0	0	0	0	0
Conillera	4	NO	0	0	0	0,701	1	0	0	0	0	0
N'Esponja	5	NO	0	0	0	0,701	1	0	0	0	0	0
Na Redona	9	NO	1	1	0	0,699	2	0,389 ( $\pm 0,164$ )	0,00085 ( $\pm 0,0004$ )	0,389	0,156 <sup>NS</sup>	0,477 <sup>NS</sup>
Ses Rates	5	NO	2	2	0	0,698	2	0,4 ( $\pm 0,237$ )	0,00176 ( $\pm 0,0010$ )	0,8	-0,973 <sup>NS</sup>	1,04 <sup>NS</sup>
Na Imperial	5	NO	0	0	0	0,697	1	0	0	0	0	0
Ses Bledes	2	NO	0	0	0	0,697	1	0	0	0	0	0
Fonoll	2	NO	2	2	0	0,699	2	1	0,0044 ( $\pm 0,0022$ )	2	-	-
Esclata-sang	4	NO	1	1	0	0,701	2	0,5 ( $\pm 0,265$ )	0,0011 ( $\pm 0,0006$ )	0,5	-0,612 <sup>NS</sup>	0,172 <sup>NS</sup>
Estel Xapat	3	NO	1	0	0	0,697	0	0	0	0	-	-
Estel Xapat-Carabassot	93	NO	17	10	7	0,698	15	0,829 ( $\pm 0,025$ )	0,00558 ( $\pm 0,0007$ )	2,540	-0,677 <sup>NS</sup>	-2,272 <sup>NS</sup>
Estel des Coll	3	NO	1	0	0	0,697	0	0	0	0	-	-
Estel de Fora	93	NO	17	10	7	0,698	15	0,829 ( $\pm 0,025$ )	0,00558 ( $\pm 0,0007$ )	2,540	-0,677 <sup>NS</sup>	-2,272 <sup>NS</sup>
<b>Arxipèlag</b>												

**Taula 2:** Paràmetres de diversitat genètica i índex de neutralitat per cada illot i l'arxipèlag. Nombre de mostres (N), nombre d'insercions-deleccions (Indel), nombre de posicions nucleotídiques variables (S), transicions (Ts), transversions (Tv), contingut d'adenina i timina (A+T), nombre d'haplotips (H), diversitat haplotípica (Hd) amb la desviació estàndard, diversitat nucleotídica ( $\pi$ ) amb la desviació estàndard, nombre mitjà de diferències entre dues seqüències (K), test D de Tajima (D) i test Fs de Fu (Fs). NS: no significatiu.



**Figura 6:** Mapa haplotípic i mapa geogràfic de l'Arxipèlag de Cabrera. El tamany dels cercles correspon al nombre d'individus que tenen aquell haplotip i els punts negres indiquen haplotip buits.



**Figura 7:** Arbre de màxima verosimilitud.

L'arbre filogenètic detecta baixos nivells de bootstrap, essent el més baix de 28 i el més alt de 87. Es detecten tres clades com en el mapa haplotípic, el primer clade està format per les illes del nord, el segon per tres de les illes del sud: Estel Xapat, Estel de Fora i Esclata-sang; i el tercer compost per Cabrera Gran i les illes del voltant.

A altres estudis filogenètics, en els que s'han analitzat individus de *P. lilfordi* de totes les poblacions de balears, s'ha pogut observar que el clade format per les illes del nord de l'Arxipèlag de Cabrera comparteixen clade amb les poblacions del nord-est i sud de Mallorca i que la separació entre els diferents clades es va donar durant el Plistocè, en el període interglacial (Brown et al., 2008; Terrasa et al., 2004).

Per tant, la sargantana balear, al ser catalogada com una espècie en perill d'extinció, és important tenir clar quines unitats evolutivament significatives hem de conservar. L'existència de tres clades a l'Arxipèlag de Cabrera, fa que almenys tres haplotips hagin de ser reconeguts com a ESUs per així poder utilitzar-los, si és necessari, per fer reintroduccions a illes o illots en els quals s'hagin extingit o la densitat poblacional sigui insuficient per assegurar la seva supervivència.

## 6. Conclusions

- *P. lilfordi* presenta una alta variabilitat genètica dins l'arxipèlag. Entre les diferents poblacions la variabilitat és diversa, es troben illots en els que la diversitat és inexistent o pràcticament inexistent i altres illes, sobretot les que presenten major àrea, en les que la diversitat és alta.

- A Cabrera Gran s'han trobat haplotips compartits amb els illots del nord i del sud, el que fa pensar que va actuar com una illa de refugi i per tant com a reservori genètic.
- S'estableixen tres clades dins l'Arxipèlag de Cabrera. El primer clade format per les illes del nord, el segon clade per Cabrera Gran i les illes del voltant i el tercer format per tres illes del sud (Estel Xapat, Estel de Fora i Esclata-sang).

## 7. Referències

- Arnold, E. N., Arribas, O., & Carranza, S. (2007). Systematics of the Palaeartic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata:Lacertidae:Lacertinae) with descriptions of eight new genera. *Zootaxa*, 1430, 1-86.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., ... & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 489-522.
- Böhme, M. U., Fritsch, G., Tippmann, A., Schlegel, M., & Berendonk, T. U. (2007). The complete mitochondrial genome of the Green Lizard *Lacerta viridis viridis* (Reptilia: Lacertidae) and its phylogenetic position within squamate reptiles. *Gene*, 394(1-2), 69-77.
- Boore, J. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8), 1767-1780.
- Brehm, A., James Harris, D., Alves, C., Jesus, J., Thomarat, F., & Vicente, L. (2003). Structure and evolution of the mitochondrial DNA complete control region in the lizard *Lacerta dugesii* (Lacertidae, Sauria). *Journal of Molecular Evolution*, 56(1), 46-53.
- Brown, R. P., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Castro, J. A., Hoskisson, P. A., Picornell, A., & Ramon, M. M. (2008). Bayesian estimation of post-Messinian divergence times in Balearic Island lizards. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1), 350-358.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M. & Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human – induced species losses : Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1(5), 1-6.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657-1660.
- Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R. R., Mace, G. M., & Wayne, R. K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(7), 290-295.
- Duran, C., Appleby, N., Edwards, D., & Batley, J. (2009). Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. *Current Bioinformatics*, 4(0), 16-27.
- Frankham, R. (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 22-29.

- Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693–709.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541–4550.
- Gissi, C., Iannelli, F., & Pesole, G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101(4), 301–320.
- 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.
- Harris, D. J., & Sá-Sousa, P. (2002). Molecular phylogenetics of Iberian wall lizards (Podarcis): Is Podarcis hispanica a species complex? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(1), 75–81.
- Hewitt, G. M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography--or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10(3), 537–549.
- Jermiin, L. S., Graur, D., Lowe, R. M., & Crozier, R. H. (1994). Analysis of directional mutation pressure and nucleotide content in mitochondrial cytochrome b genes. *Journal of Molecular Evolution*, 39(2), 160–173.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Moritz, C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary process that ... *Systematic Biology*, 51(2), 238–254.
- Moritz, C., Dowling, T. E., & Brown, W. M. (1987). Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 269–292.
- Oliverio, M., Bologna, M. a, & Mariottini, P. (2009). Molecular of the Mediterranean biogeography lizards PodarcisWagler , 1830 and Teira Gray , 1838 Lacertidae ). *Science*, 27(6), 1403–1420.
- Palsbøll, P. J., Bérubé, M., & Allendorf, F. W. (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1), 11–16.
- Pearce, J. M. (2006). Minding the gap: Frequency of indels in mtDNA control region sequence data and influence on population genetic analyses. *Molecular Ecology*, 15(2), 333–341.
- Pereira, S. L. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 745–752.
- Pérez-Mellado, V., Hernández-Estévez, J. Á., García-Díez, T., Terrassa, B., Ramón, M. M., Castro, J., Picornell, A., Martín-Vallejo, J., Brown, R. (2008). Population density in Podarcis lilfordi (Squamata, Lacertidae), a lizard species endemic to small islets in the



- Balearic Islands (Spain). *Amphibia Reptilia*, 29(1), 49–60.
- Perfectti, F., Picó, F. X., & Gómez, J. M. (2009). La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas*, 18(1), 10–16.
- Salvador, A. (2009). Lagartija balear - *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874). *Enciclopedia Virtual de Los Vertebrados Españoles*.
- Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., & Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205(1), 125-140.
- Servera J (1993) Generalitats fisiogràfiques. A: *Història Natural de l'Arxipèlag de Cabrera* (eds. Alcover JA, Ballesteros E, Fornós JJ), pp. 25-32. CSIC-Edit. Moll. Mon. Soc. Hist. Nat, Palma (Illes Balears).
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.
- Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Brown, R. P., Picornell, A., Castro, J. A., & Ramon, M. M. (2009a). Foundations for conservation of intraspecific genetic diversity revealed by analysis of phylogeographical structure in the endangered endemic lizard *Podarcis lilfordi*. *Diversity and Distributions*, 15(2), 207–221.
- Terrasa, B., Picornell, a., Castro, J. a., & Ramon, M. M. (2004). Genetic variation within endemic *Podarcis* lizards from the Balearic Islands inferred from partial Cytochrome b sequences. *Amphibia-Reptilia*, 25(4), 407–414.
- Terrasa, B., Rodríguez, V., Pérez-Mellado, V., Picornell, A., Brown, R. P., Castro, J. A., & Ramon, M. M. (2010). Use of NCPA to understanding genetic sub-structuring of *Podarcis lilfordi* from the Balearic archipelago. *Amphibia Reptilia*, 30(4), 505–514.
- Terrasa, B., Rodríguez, V., Pérez-mellado, V., Picornell, A., Castro, J. A., & Ramon, M. M. (2009c). Sargantana Balear.