



Universitat
de les Illes Balears

**CANVI EVOLUTIU DELS LACÈRTIDS
DE LA MEDITERRÀNIA OCCIDENTAL:
ESTIMES EN EL GENOMA NUCLEAR**

JOANA MARIA BUADES PAYERAS

**TESI DOCTORAL
2017**



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL
2017

**Programa de Doctorat de Biotecnologia, Genètica i
Biologia Cel·lular**

**CANVI EVOLUTIU DELS LACÈRTIDS DE LA
MEDITERRÀNIA OCCIDENTAL: ESTIMES EN
EL GENOMA NUCLEAR**

Directora: Dra. Cori Ramon Juanpere
Directora: Dra. Antònia Picornell Rigo

Joana Maria Buades Payeras

Doctora per la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

Dra. Cori Ramon Juanpere, Catedràtica d'Universitat i la Dra. Antònia Picornell Rigo, Professora Titular d'Universitat, ambdues de l'àrea de Genètica de la Universitat de les Illes Balears.

DECLAREN:

Que la tesi doctoral que duu per títol '**Canvi evolutiu dels lacèrtids de la Mediterrània occidental: estimes en el genoma nuclear**', presentada per Joana Maria Buades Payeras per a l'obtenció del títol de Doctora en Biotecnologia, Genètica i Biologia Cel·lular, ha estat dirigida sota la nostra supervisió a l'àrea de Genètica de la Universitat de les Illes Balears.

I perquè quedi constància d'això signen aquest document.

Dra. Cori Ramon Juanpere

Dra. Antònia Picornell Rigo

Palma, 19 de juny de 2017

AGRAÏMENTS

Encara que no m'ho pareixi, aquest camí ja s'acaba i ha arribat el moment d'escriure els agraïments...En aquest camí m'he topat amb molta gent que d'una manera o altra sempre heu estat allà, al meu costat, fent real una oportunitat que creia que mai tendria. Gràcies a tots els que heu fet possible que arribi a defensar la Tesi Doctoral.

Les paraules de gratitud no seran mai suficients per intentar expressar el que sent per vosaltres, Dra. Cori Ramon i Dra. Antònia Picornell, les meves directores, les meves guies, les quals admir i esper estar a l'alçada. Cori, han estat uns anys al teu costat on sempre hi has estat i m'has ajudat en tot (aconsegueixes fer fàcil el més complicat); el teu coneixement i la teva infinita curiositat científica han estat un motor de motivació i una empenta a seguir i sempre voler saber més. Tenc ben clar que tenim pendent el melanisme i esperem ben aviat...De la part personal no puc fer més que donar-te les gràcies de tot cor per cuidar-me, ensenyar-me i escoltar-me com una mare i ara també, com una àvia. Antònia, sense tu aquest viatge no hauria ni començat, gràcies per confiar amb mi, acollir-me a com alumne col·laboradora i poder així iniciar aquest somni. Em vas fer veure que la genètica és fascinant i em vas atreure fins aquest món de la investigació que sabem que és dur però també molt enriquidor. Han estat uns anys al teu costat en què he après, i molt! T'he d'agrair la teva ajuda incondicional en investigació ajudant a llevar pedretes del camí (les estones que vam passar llegint dobles pics!). Però sobretot moltíssimes gràcies, Antònia, per les xerrades i les teves paraules quan les he necessitat, i per animar-me i fer-me veure què puc! (deixa'm que ara sigui jo la que et digui que pots amb tot i més), no oblidaré mai la teva part humana que ha estat imprescindible durant tot el camí. En definitiva, gràcies a totes dues, per formar-me com una gran professional, amb un esperit crític, i a la vegada ajudar-me a créixer com a persona i fer-me gran al vostre costat.

Al Dr. José Castro per ensenyar-me tant durant la carrera, i estar sempre disposat a donar un cop de mà en tot el que el necessités. Pepe, amb el teu humor i el teu tarannà has aconseguit treure una rialla en els dies grisos, gràcies.

A la Dra. Bàrbara Terrasa, per ser de gran ajuda durant aquests anys ja fos amb el *Beast* com cercant i recercant en tots els teus arxius (ho podreu comprovar amb les nombroses imatges que trobareu a la tesi, precioses!). I també, clar, per aconseguir treure'm la bata i posar-me la bota (esperem poder repetir sortides ben aviat).

Al Dr. Valentín Pérez Mellado, gran expert i reconegut herpetòleg, que ha estat fonamental en la investigació (gràcies per la infinitat de mostres recollides!); coneixement que va acompanyat d'una important passió per la seva feina i amor a les sargantanes. A més a més, també ha permès il·lustrar i enriquir aquesta tesi amb les seves fotografies meravelloses, gràcies. Al Dr. Richard Brown vull agrair-li tot el seu coneixement i la seva ajuda amb els diferents programes bioinformàtics i també, el seu indispensable assessorament tècnic en l'aspecte lingüístic.



A la resta dels membres de l'àrea de Genètica, al Dr. Eduard Petitpierre, al Dr. Carlos Juan, per tots els seus sabers durant la carrera i en aquests anys al laboratori. No em puc deixar el Dr. Joan Pons que m'ha animat amb les seves visites i les seves entretingudes xerrades al seminari.

Aquesta tesi, en bona part, s'ha pogut dur a terme gràcies a la beca predoctoral que em va ser concedida l'any 2012 (FPI/1488/2012) per part de la Conselleria d'Innovació, Recerca i Turisme del Govern de les Illes Balears, juntament amb el Fons Social Europeu. Gràcies per donar-me l'oportunitat que m'ha permès aprendre tant i formar-me com a personal investigador. També ha estat imprescindible el suport econòmic del Ministeri d'Educació i Ciència de l'Estat Espanyol a través de la concessió de diversos projectes d'investigació al grup de Genètica (CGL2012-39850-C02-01 i CGL2015-68139-C2-1-P).

Al Dr. Andreu Rotger, i al seu director, el Dr. Giacomo Tavecchia, per convidar-me a una sortida de camp a Moltona i permetre'm aprendre més de les sargantanes i gaudir d'una molt bona experiència. I li vull agrair, també, que em facilités mostres d'alguns individus per a les investigacions.

A Trinidad Garcia, del servei de seqüenciació de la Universitat de les Illes Balears, per tota la feina d'aquests anys, per resoldre els problemes tècnics que sorgien i trobar sempre un moment del seu temps o un foradet a la placa per carregar les mostres encara que no hi hagués lloc. A la vegada, com a amiga, ja que hem compartit bons moments juntes, gràcies.

A la resta del personal de l'edifici (Macià, Andreu, Aina, Pep Miquel, Xisco, Carme, ...) moltes gràcies per ser-hi quan us necessitava i resoldre'm més d'un problema.

Als companys del Laboratori de Genètica, que heu estat al meu costat (i m'heu aguantat!) dia rere dia i heu fet del camí una experiència fantàstica...Sou companys, sou amics, sou família. A na Luz Gómez i a n'Ana Castillo per tots els bons moments juntes i per tota la seva ajuda, no us penseu que m'he oblidat dels sopars pendents! A la Dra. Marina Matas (sa meva 'zipi') per acompanyar-me i descobrir-me cada dia noves experiències i coneixements, tant al laboratori com fora d'ell (ets una 'cocinitas', una 'manitas'...); vull agrair-te la teva paciència contestant totes les preguntes, però sobretot gràcies per ser una millor amiga i confident. Estic ben segura que amb les noves generacions encara ens queden molts bons moments per viure tots junts. A la Dra. Virginia Rodríguez, vull donar-li les gràcies per ensenyar-me sempre més i ajudar-me quan ho necessitava, hem compartit molt en aquests anys. Al Dr. Jose Jurado (o millor dit Dr. Google, com ho fas per saber tant?!) per l'ajuda incondicional i per estar sempre disposat a donar un cop de mà en el que faci falta, moltíssimes gràcies. A la (Dra., va, ja no queda res!) Joana Francesca o JF, per ser com ets i per arribar cada matí i contagiar la teva alegria i bon humor, has il·luminat el meu camí quan pareixia que tot era fosc. Gràcies per compartir amb mi els bons i els mals moments i saber que tenc i tens una amiga per sempre. Però això no s'acaba perquè sempre hi ha més alegria! A (Dr. *el último del 'trio tesis'*) Sergio Ramírez, que va arribar sense fer renou, passant quasi

desapercebut, però que ha sabut fer-se un lloc i cada dia t'enyoram més quan no vens!, gràcies per ajudar-me quan et necessitava i al teu increïble guacamole! Jejeje i a l'àrea de Genètica que no sé com ho fan però 'fitxen' els millors i les futures generacions de genètics ja són aquí! Marta i Iris, sou un Sol, els meus ropits. Marta, sempre hi ets per donar un cop de mà amb tot (les mostres, els arxius, articles...) i sempre amb una rialla! Gràcies per escoltar-me quan ho necessitava i molts d'ànims en aquesta aventura, en el fons sé que arribaràs a estimar els nuclears. I a tu, la nostra petita, Iris, encara que pareixi un adéu no ho és i vull que tenguis ben present que sempre hi sóc i hi seré pel que necessitis; has de començar un camí llarg però pots amb això i més, ànims! Gràcies per ser-hi sempre. Un *Genetic Team*, que ha fet que aquest viatge sigui un gust, oblidant els moments durs i fent que només perdurin els bons, milers de gràcies!!

Aquest agraïment és en especial per les sargantanes, ja que sense elles tot aquest treball no s'hauria pogut dur a terme! Gràcies a totes i cada una d'elles que d'una manera involuntària han participat amb el seu ADN ajudant a intentar esclarir algunes qüestions de la ciència.

Vosaltres també heu estat importants, amics i família, ja que d'una manera o altra m'heu ajudat! Gràcies per la vostra preocupació i per demanar sempre com m'anava i encoratjar-me a seguir i tirar endavant. Encara me'n record, Joan Enric i Margalida, estant al sofà de ca vostra repetint un parell (mallorquí) de vegades el resum per l'entrevista de la beca...tant malament no va anar! Gràcies per les xerrades i tots els ànims, sou molt importants per mi! però ara he de dir que amb tota la tropeta crec ja ens serà impossible assajar la tesi! Elisa, Antoni i Rafel, sou uns amors i de ben segur ens queda un camí ple de vivències úniques i apassionants! Gràcies per tot el vostre amor!

Jo no se si m'ho creia del tot, que arribaria fins aquí, però vosaltres sí, i per això des de l'inici de la carrera heu confiat amb mi i heu estat al meu costat, moltíssimes gràcies Papà i Mamà, pel vostre suport i amor incondicional. Sé que també ha estat dur per a vosaltres i heu passat pena en més d'un moment, per això us vull agrair tant, i que sapigueu que sense vosaltres res de tot això no hauria pogut ser possible! Us estim molt!

No et pensis que et quedes enrere, encara que ara estiguis en la distància sé que et tenc ben aprop (i tu a mi!) i també t'he d'agrair haver pogut arribar fins aquí. Tomeu, has estat un suport, a la memòria hi ha aquell dia quan te'm vas assegurar devora i em vas reconfortar amb les teves paraules quan creia no podia més, i mira fins on he arribat. Ara et queda a tu el camí per recórrer, serà dur i pesat, però encara que es faci llarg, lluita. Recorda sempre que tu pots i, al final, val molt la pena.



Això no pot acabar sense vosaltres (que heu viscut en primera persona tot el viatge), sense agrair-vos tots i cada un dels dies junts, sou el meu pilar i el meu motor. Carles (el Sol està massa a prop per tu), des del primer dia has aconseguit fer-me confiar amb mi i creure-hi, milions de gràcies per tot el teu suport i per acompanyar-me (i aguantar-me!) en aquest viatge que no ha estat ni serà fàcil; però de ben segur que junts arribarem on faci falta. Et deix unes quantes pàgines perquè les puguis llegir i rellegir, on fer-te veure que les sargantanes són molt importants, jejeje. I a tu, la meva estimada Aina, la que darrerament només ha sentit: 'espera un moment que acabi...', 'només serà un segon...'. Gràcies per la teva infinita paciència i el teu amor. Aina, fins a sa Lluna i tornar!

Joana Maria

RESUM DE LA TESI DOCTORAL

La tesi forma part d'un projecte més ampli sobre l'estudi evolutiu de sargantanes del gènere *Podarcis* (Wagler, 1830), amb especial referència a poblacions insulars. Aquest gènere està constituït per un grup divers de rèptils que ha evolucionat diversificant-se a la Mediterrània. Les espècies del gènere *Podarcis* mostren una espectacular diversitat fenotípica. A nivell de coloració a diferents illes podem trobar poblacions totalment melàniques, uniformement verdes o marrons, inclús coloracions intermèdies, no estant resolts els possibles mecanismes causants.

El gènere *Podarcis* inclou diversos endemismes insulars, per exemple a Còrsega i Sardenya trobem *Podarcis tiliguerta* i a les Illes Balears, *P. lilfordi* i *P. pityusensis*. La conca mediterrània és considerada un *hotspot* o punt calent de biodiversitat, per l'elevat nombre d'espècies endèmiques existents. Per això, són regions molt interessants per estudiar i aplicar estratègies de conservació, necessàries tenint en compte la reducció i/o degradació d'hàbitats. Per aquesta finalitat conèixer la història evolutiva de les espècies que hi viuen és imprescindible.

Aquesta tesi se centra en l'estudi, a nivell molecular, del canvi evolutiu de diverses espècies de *Podarcis* d'aquesta regió. Recentment alguns autors han qüestionat que s'utilitzi com a únic marcador l'ADN mitocondrial (ADNmt), emprat àmpliament per aquest tipus d'estudis, ja que sols representa una petita part de l'evolució. És, per tant, recomanable emprar diversos marcadors moleculars, així l'ús conjunt d'ADNmt i marcadors nuclears permet obtenir resultats més consistents.

En la tesi s'analitza la variabilitat que presenten distints gens nuclears amb l'objectiu d'estudiar la història evolutiva d'algunes espècies d'aquest gènere; més concretament s'aprofundeix en el coneixement de dues qüestions evolutives en base als canvis en la seqüència dels exons dels següents gens: *MC1R*, *RAG1*, *APOBE28*, *BLC9L*, *KIAA2018* i *KIF24*. Aquests canvis es correlacionen amb els de l'ADNmt en les mateixes poblacions.

i) Factors que determinen el melanisme en poblacions insulars

S'han estudiat poblacions de *Podarcis lilfordi* i *P. pityusensis*, espècies amb una gran diversitat de coloracions. Per tal de relacionar canvis en el genoma amb el melanisme es va estudiar la variabilitat de la seqüència de l'*MC1R* (gen implicat en la pigmentació a altres espècies). Els resultats van mostrar que mutacions en aquest gen no estan lligades al fenotip melànic, i tampoc a les altres coloracions estudiades. Per això, posteriorment es va analitzar si canvis d'expressió a l'*MC1R* en serien els responsables, però no es va detectar cap canvi significatiu.

Es va analitzar també el perfil d'expressió de tot l'exoma d'individus melànics i no melànics de dues poblacions de *P. lilfordi*. Dels resultats destacar aquestes diferències: els individus no melànics presentaven una major expressió de gens implicats en la resposta a l'estrès, mentre que els melànics mostraven una major taxa metabòlica i un increment de la resposta inflamatòria enfront d'antígens exògens.



Donat que cap de les vies està relacionada directament amb el procés de melanogènesi, altres gens deuen ser els responsables del melanisme.

ii) La filogenia i filogeografia de diverses espècies endèmiques

S'ha determinat la filogeografia de *P. tiliguerta* datant els principals successos cladogenètics a partir del seu origen fa uns 11 milions d'anys. Els resultats s'han comparat amb els de l'ADNmt, i mostren que en ambdós marcadors hi ha un gran nivell de diversitat especialment entre l'illa de Sardenya i Còrsega, cosa que permet considerar que a nivell genètic podrien ser considerades dues espècies distintes (separades fa uns 9,5 Ma).

També s'ha estudiat les *Podarcis* de l'arxipèlag de les Columbretes (est d'Espanya). L'espècie, sense assignació taxonòmica clara, prèviament considerada *P. atrata* i subespècie de *P. hispanica*. A través dels gens nuclears i mitocondrials s'ha intentat definir les relacions filogenètiques. Els resultats indiquen que estan més properes al nou taxó *P. liolepis*.

RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL

La tesis forma parte de un proyecto más extenso sobre el estudio evolutivo de las lagartijas del género *Podarcis* (Wagler, 1830), haciendo especial énfasis en poblaciones insulares. Este género está formado por un grupo diverso de reptiles que evolucionó diversificándose en el Mediterráneo. Las especies del género *Podarcis* muestran una espectacular variabilidad fenotípica. En diferentes islas, a nivel de coloración, encontramos poblaciones totalmente melánicas, uniformemente verdes o marrones, e incluso coloraciones intermedias, permaneciendo aún desconocidos los posibles mecanismos causantes.

El género *Podarcis* engloba diversos endemismos insulares, cómo *Podarcis tiliguerta* de Córcega y Cerdeña y *P. lilfordi* y *P. pityusensis* de las Islas Baleares. El Mediterráneo se considera un *hotspot*, o punto caliente de biodiversidad, debido al importante número de especies endémicas. Consecuentemente son regiones muy interesantes para estudiar y aplicar estrategias de conservación, necesarias teniendo en cuenta la reducción y/o degradación de hábitats. Para este fin, es imprescindible conocer la historia evolutiva de las especies que viven allí.

Esta tesis se centra en el estudio, a nivel molecular, del cambio evolutivo de diversas especies de *Podarcis* de esta región. Recientemente algunos autores cuestionan el ADN mitocondrial (ADNmt) como único marcador, ya que sólo representa una pequeña parte de la evolución. Por consiguiente, se recomienda utilizar diferentes marcadores, así el uso del ADNmt junto a marcadores nucleares permite conseguir unos resultados más robustos.

En la tesis se analiza la variabilidad de diferentes genes nucleares con la finalidad de estudiar la historia evolutiva de algunas especies de este género; centrándose en dar respuesta a dos preguntas evolutivas en base a cambios en la secuencia de los exones de estos genes: *MC1R*, *RAG1*, *APOBE28*, *BLC9L*, *KIAA2018* y *KIF24*. Estos cambios se relacionan con los del ADNmt en las mismas poblaciones.

i) Factores que determinan el melanismo en poblaciones insulares

Se han estudiado poblaciones de *Podarcis lilfordi* y *P. pityusensis*, especies con una amplia diversidad de coloraciones. Con el fin de relacionar cambios en el genoma con el melanismo, se estudió la variabilidad de la secuencia del *MC1R* (gen implicado en la pigmentación en otras especies). Los resultados mostraron que mutaciones en este gen no estaban relacionadas con el fenotipo melánico, y tampoco con las otras coloraciones estudiadas. Por eso se analizó si variaciones de expresión en el *MC1R* eran las responsables, aunque no se detectó ningún cambio significativo.

También se analizó el perfil de expresión del exoma de individuos melánicos y no melánicos de dos poblaciones de *P. lilfordi*. Los resultados indicaron diferencias, destacando que los individuos no melánicos mostraban una mayor expresión de genes implicados en la respuesta frente a el estrés, mientras que los melánicos presentaban



una mayor tasa metabólica y un incremento de la respuesta inflamatoria frente antígenos exógenos. Dado que ninguna de las vías está relacionada directamente con la melanogénesis, otros genes deben ser responsables del melanismo.

ii) La filogenia y filogeografía de diversas especies endémicas

Se determinó la filogeografía de *P. tiliguerta* datando los principales eventos cladogenéticos desde su origen hace unos 11 millones de años. Los resultados se compararon con los del ADNmt, indicando en ambos marcadores una elevada diversidad, especialmente entre la isla de Cerdeña y Córcega, lo que indica que a nivel genético podrían ser consideradas dos especies distintas (separadas hace unos 9,5 Ma).

También se estudió la especie *Podarcis* del archipiélago de las Columbretes (este de España). La especie no presenta una taxonomía clara (previamente fue considerada *P. atrata* y una subespecie de *P. hispanica*). Para definir sus relaciones filogenéticas se utilizaron genes nucleares y mitocondriales. Los resultados indicaron que estas poblaciones de Columbretes están más próximas al nuevo taxón *P. liolepis*.

DOCTORAL THESIS ABSTRACT

This thesis comprises part of a wider project that addresses the evolution of Mediterranean lizards of the genus *Podarcis* (Wagler, 1830), and is mainly focused on insular populations. This genus is widespread across the Mediterranean basin. They exhibit a great intraspecific variability in morphological traits. In particular, melanic and non-melanic populations (which are completely green or brown, and/or with intermediate coloration) are found on different islands. The causes for this variability remain unknown.

The *Podarcis* genus contains various insular endemism such as *Podarcis tiliguerta* from Corsica and Sardinia islands, and *P. lilfordi* and *P. pityusensis* from the Balearic archipelago. The Mediterranean basin is considered a biodiversity hotspot due to the presence of an exceptional number of endemic species and *Podarcis* provides an important component of this biodiversity. It can provide information on the effects of fragmentation and/or degradation of habitat. Analyses of *Podarcis* also have important implications for conservation of the group itself: understanding the evolutionary framework provides a basis for future conservation actions.

The present thesis is focused on the molecular study of the evolution of several Mediterranean *Podarcis*. It aims to build on and extend previous studies that made evolutionary inferences from just the mitochondrial DNA. This is achieved by analysing several nuclear markers (*MC1R*, *RAG1*, *APOBE28*, *BLC9L*, *KIAA2018* and *KIF24*) in combination with mtDNA data.

The main aim is to address two important evolutionary questions:

- i) Factors determining melanism in insular populations

P. lilfordi and *P. pityusensis* present an important colour variation and polymorphism in the *MC1R* gene has been related to pigmentation in other species. Therefore, the relationship between DNA substitutions and melanism in different populations was studied. We did not detect any differences in the *MC1R* sequence that we analysed and so this sequence does not appear to be the basis of the colour variation in these Balearic *Podarcis*.

Differences in gene expression were also compared between melanic and non-melanic individuals, but no differences that were directly related to *MC1R* expression were detected. Nevertheless, the transcriptome profiles of melanic and non-melanic individuals from two populations of *P. lilfordi* did show some differences. The main differences found between the two groups were: non-melanic samples showed over-expression of stress-response genes, while melanic individuals had higher metabolic rates and an increased inflammatory response to exogenous antigens. Despite finding differences in expression, our study was unable to reveal major insights into the genetic basis of melanism in these island lizards.



ii) Phylogeny and phylogeography of different endemic species.

This work contributes important findings relevant to the systematics and evolution of the species *P. tiliguerta* endemic to Corsica and Sardinia. Using Bayesian phylogenetic dating, we determined that this species originated ~11 Ma ago. Both markers (nuclear genes and mtDNA) showed a high level of intraspecific divergence, especially between Corsica and Sardinia. Ancient divergence (which was estimated at 9.5 Ma ago) and associated high levels of between-island lineage sorting in nuclear markers support the view that Corsican and Sardinian populations should be recognized as two different species.

Podarcis were also studied from the Columbretes archipelago, a small island group off the coast east of Spain. Populations were previously recognized as a subspecies of *P. hispanica* or as *P. atrata* species. However, the suitability of this taxonomic designation has been made unclear by recent systematics studies of *Podarcis* that have led to major taxonomic changes. We used nuclear and mitochondrial genes to define their phylogenetic relationships. Columbretes populations were found to be most closely related to the new taxon *P. liolepis*.



PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESI

- J. M. Buades, V. Rodríguez, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado, R. P. Brown, J. A. Castro, A. Picornell i M. M. Ramon (2013). Variability of the *mc1r* Gene in Melanic and Non-Melanic *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis* from the Balearic Archipelago. PLoS One, 8(1), e53088.

- V. Rodríguez, J. M. Buades, R. P. Brown, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado, C. Corti, M. Delaugerre, J. A. Castro, A. Picornell i M. M. Ramon. (2017). Evolutionary history of *Podarcis tiliguerta* on Corsica and Sardinia. BMC Evolutionary Biology, 17(1), 27.

- J. M. Buades, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado, R. P. Brown, A. Pérez-Cembranos, J. A. Castro, A. Picornell i M. M. Ramon. Melanism in insular lizards: No differential MC1R gene expression but differences in metabolic rate and inflammatory response detected by transcriptome analysis. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology (enviat).



LLISTA D'ABREVIATURES

| | |
|-------------|--|
| aa | Aminoàcid |
| ACTB | Gen de la β -actina |
| ACTH | Hormona adrenocorticotròpica |
| ADN/DNA | Àcid desoxiribonucleic |
| ADNc/cDNA | Àcid desoxiribonucleic complementari |
| ADNmt/mtDNA | Àcid desoxiribonucleic mitocondrial |
| ADNn/nDNA | Àcid desoxiribonucleic nuclear |
| AICc | <i>Akaike information criterion corrected</i> |
| AMOVA | <i>Analysis of Molecular Variance</i> |
| AMPc | Monofosfat d'adenosina cíclic |
| ANEI | Àrea Natural d'Espècial Interès |
| APOBE28 | Apolipoproteïna B exó 28 |
| ARIP | Àrea Rural d'Interès Paisatgístic |
| ARN/RNA | Àcid ribonucleic |
| ARNm/mRNA | Àcid ribonucleic missatger |
| ARNr/rRNA | Àcid ribonucleic ribosòmic |
| ARNt/tRNA | Àcid ribonucleic de transferència |
| ASIP | <i>Agouti signalling protein</i> |
| ATP | Adenosina trifosfat |
| BAPS | <i>Bayesian Analysis of Population Structure</i> |
| BEAST | <i>Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees</i> |
| BLC9L | <i>B-cell CLL/lymphoma 9-like</i> |
| BPEC | <i>Bayesian Phylogeographic and Ecological Clustering</i> |
| BP | <i>Biological Process</i> |
| BP | <i>Before present</i> |
| BPP | <i>Bayesian Phylogenetics and Phylogeography</i> |
| bPTP | <i>Bayesian Poisson Tree Processes model</i> |
| C-mos | <i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor gene</i> |
| C-terminal | Extrem carboxil |
| CC | <i>Cellular Component</i> |
| CERFA | <i>Centre d'enregistrament et de révisión des formulaires administratifs</i> |
| COI | Subunitat I de la citocrom C oxidasa |
| Cp | <i>Crossing point</i> (punt de creuament) |
| CR | Regió control |
| Ct | <i>Threshold value</i> (valor umbral) |
| Cytb | Citocrom b |
| DEPC | Dietil pirocarbonat |
| dNTPs | Desoxiribonucleòtids |
| EN | <i>Endangered</i> , en perill |
| ESS | <i>Effective sample size</i> |
| et al. | <i>Et alii</i> , i altres |
| FC | <i>Fold change</i> |
| FEDER/ERDF | <i>European Regional Development Fund</i> |



| | |
|-----------------|---|
| FT | <i>Flow-through</i> |
| G | Distribució gamma |
| GMYC | <i>Generalized Mixed Yule Coalescent</i> |
| GO | <i>Gene Ontology</i> |
| GPCR | Receptors associats a proteïnes G |
| h | Nombre d'haplotips |
| h. | Habitants |
| Hd | Diversitat haplotípica |
| HPD | <i>Highest Posterior Density</i> |
| IGC | Institut Geològic de Catalunya |
| INDEL | Polimorfisme d'inserció i/o deleció |
| IUCN | <i>International Union for the Conservation of Nature</i> |
| IUGS | <i>International Union of Geological Sciences</i> |
| jrMCMC | <i>Reversible-jump Markov Chain Monte Carlo</i> |
| Kb | Mil parell de bases |
| KEGG | <i>Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes</i> |
| KIAA2018 | = USF3 (<i>Upstream transcription factor family member 3</i>) |
| KIF24 | <i>Kinesin family member 24</i> |
| LC | <i>Least Concern</i> , preocupació menor |
| LGM | <i>Last Glacial Maximum</i> |
| LOR | <i>Log odds ratio</i> |
| Ma | Milions d'anys |
| MATP | Proteïna transportadora associada a membrana |
| MC1R | Receptor 1 de la melanocortina |
| MCH/MHC | Hormona concentradora de melanina |
| MCMC | <i>Markov Chain Monte Carlo</i> |
| MCR | Melanocortines |
| MDS | Escalat multidimensional |
| MEPA | <i>Environment Protection Directorate of Malta</i> |
| MF | <i>Molecular Function</i> |
| MRE | <i>Melanogenesis related-Enzymes</i> |
| MSC | <i>Messinian Salinity Crisis</i> , Crisi Messiniana |
| (α)MSH | Hormona estimuladora dels (α -)melanòcits |
| N | Nombre |
| N- terminal | Extrem amino |
| NA | No amenaçada |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleòtid |
| ND1/2 | <i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1/2</i> |
| NPCL | <i>Nuclear Protein Coding Loci</i> |
| ns | No significant |
| nt | Nucleòtid |
| NT | <i>Near Threatened</i> , quasi amenaçada |
| o/n | <i>Overnight</i> , tot el vespre |
| OCA2/3 | Proteïna transmembrana del melanosoma |
| pb/bp | Parells de bases |
| PCR | Reacció en cadena de la polimerasa |
| phi | <i>Pairwise Homoplasmy Index</i> |



| | |
|--------------|---|
| Pi | Diversitat nucleotídica |
| PTP | <i>Poisson Tree Processes model</i> |
| qPCR | PCR quantitativa |
| qRT-PCR | PCR quantitativa en temps real |
| R | Rara |
| <i>RAG1</i> | Gen activador de la recombinació 1 |
| RIN | <i>RNA Integrity Number</i> |
| RNAseq | <i>RNA sequencing</i> |
| rpm | Revolucions per minut |
| SDS | Dodecil sulfat sòdic |
| SE | <i>Standard error</i> |
| SNP | Polimorfisme de nucleòtid simple |
| STR | <i>Short Tandem Repeat</i> |
| t | Temps |
| Ta | Temperatura |
| TAE | Tampó Tris-acetat-EDTA |
| Tm | Temperatura de fusió (<i>melting</i>) |
| TYR | Tirosinasa |
| <i>TYRP1</i> | Proteïna 1 associada a la tirosinasa |
| UPGMA | <i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i> |
| URT | Universitat, Recerca i Transferència del coneixement |
| UV | Ultraviolada |
| V | Volum |
| VU | Vulnerable |

ÍNDEX

| | |
|---|----|
| i. Agraïments | |
| ii. Resum tesi doctoral (català, castellà, anglès) | |
| iii. Publicacions derivades de la tesi | |
| iv. Llista d'abreviatures | |
| 0. Índex | |
| 1. Introducció | 1 |
| 1.1. Biogeografia de la Mediterrània | 3 |
| 1.1.1. Arxipèlag balear | 11 |
| 1.2. Família Lacertidae: Gènere <i>Podarcis</i> | 14 |
| 1.2.1. Les sargantanes insulars: <i>Podarcis lilfordi</i> , <i>Podarcis pityusensis</i> i <i>Podarcis tiliguerta</i> | 17 |
| 1.2.1.1. <i>Podarcis lilfordi</i> | 18 |
| 1.2.1.2. <i>Podarcis pityusensis</i> | 20 |
| 1.2.1.3. <i>Podarcis tiliguerta</i> | 22 |
| 1.2.2. Espècies continentals de <i>Podarcis</i> | 25 |
| 1.2.2.1. <i>Podarcis muralis</i> | 25 |
| 1.2.2.2. Complex <i>Podarcis hispanica</i> | 27 |
| <i>Podarcis hispanica</i> | 29 |
| <i>Podarcis vaucheri</i> | 29 |
| <i>Podarcis liolepis</i> | 29 |
| <i>Podarcis virescens</i> | 32 |
| <i>Podarcis guadarramae</i> | 33 |
| 1.3. La pigmentació | 34 |
| 1.3.1. El melanisme | 39 |
| 1.3.2. Genètica i ambient | 40 |
| 1.3.2.1. <i>MC1R</i> | 41 |
| 1.3.2.2. <i>Agouti</i> | 44 |
| 1.3.2.3. Altres gens implicats | 45 |
| <i>TYR</i> | 45 |
| <i>TYRP1</i> | 46 |
| 1.3.3. Expressió gènica i transcriptoma | 46 |
| 2. Objectius | 49 |
| 3. Material i mètodes | 53 |
| 3.1. Seqüenciació d'exons de gens nuclears | 55 |
| 3.1.1. Mostres | 55 |
| 3.1.2. Extracció ADN | 58 |
| 3.1.3. Amplificació i purificació | 59 |
| 3.1.4. Seqüenciació i precipitació | 62 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.5. Mètodes per a l'anàlisi de dades | 62 |
| 3.1.6. Anàlisi de l'estructura poblacional i filogenètica | 64 |
| 3.2. Gen <i>agouti</i> | 67 |
| 3.3. Promotor de l'<i>MC1R</i> | 68 |
| 3.4. Estudi d'expressió gènica (ARNm) | 71 |
| 3.4.1. Gen <i>MC1R</i> | 71 |
| 3.4.1.1. Mostres | 71 |
| 3.4.1.2. Extracció ARN | 73 |
| 3.4.1.3. Quantificació i anàlisi de qualitat | 75 |
| 3.4.1.4. Digestió ADN | 76 |
| 3.4.1.5. Retrotranscripció (pas d'ARN a ADNc) | 77 |
| 3.4.1.6. Anàlisi d'expressió gènica | 78 |
| 3.4.2. Gen <i>agouti</i> | 80 |
| 3.4.3. Exoma-ARNseq | 82 |
| 3.4.3.1. Extracció i obtenció dels <i>pools</i> | 82 |
| 3.4.3.2. Obtenció de les llibreries i d'ARN i seqüenciació | 82 |
| 3.4.3.3. Bioinformàtica | 82 |
| 4. Resultats | 85 |
| 4.1. Capítol 1: Genètica del melanisme a les <i>Podarcis</i> balears | 87 |
| <i>Variability of the MC1R gene in melanic and non-melanic Podarcis</i> <i>lilfordi and Podarcis pityusensis from the Balearic Archipelago</i> | 89 |
| <i>Melanism in insular lizards: No differential MC1R gene expression but</i> <i>differences in metabolic rate and inflammatory response detected by</i> <i>transcriptome analysis</i> | 101 |
| 4.2. Capítol 2: Filogeografia d'algunes espècies del gènere <i>Podarcis</i> | 115 |
| <i>Evolutionary history of Podarcis tiliguerta on Corsica and Sardinia</i> | 117 |
| <i>Preliminary results of the phylogenetic analysis of the Columbretes</i> <i>Archipelago</i> | 139 |
| 5. Discussió general | 145 |
| 6. Conclusions | 159 |
| 7. Bibliografia | 163 |

1. INTRODUCCIÓ

1.1. BIOGEOGRAFIA DE LA MEDITERRÀNIA

La biogeografia, que estudia la distribució geogràfica dels organismes, és indispensable en l'estudi evolutiu de qualsevol espècie. Àrees com l'ecologia i la història biogeogràfica estan absolutament lligades (Posadas *et al.* 2006), ja que ambdues disciplines tenen el mateix objectiu: entendre la distribució de les espècies en funció del temps i l'espai (Crisci *et al.* 2006).

En general, els patrons biogeogràfics són conseqüència de processos geològics i ecològics que afecten la dispersió a diferents escales espacials i temporals. Fets geològics a gran escala, com la deriva continental, la formació de muntanyes i canvis en el nivell del mar, han tingut una gran influència en les distribucions geogràfiques dels organismes. Encara que els seus efectes també són regulats per limitacions ecològiques que afecten la dispersió (Wiens i Donoghue 2004).

Un major coneixement de les àrees ancestrals per un taxó és una part important de l'estudi de la història natural d'un grup concret (Posadas *et al.* 2006). La distribució actual de les espècies (i la seva història evolutiva) està molt influïda per la història geològica de l'entorn geogràfic en el qual es troben, sobretot per aquells factors que són susceptibles de crear barreres en la progressió o colonització d'una espècie (Barbadillo *et al.* 1997). El lloc on viu un determinat clade ve condicionat per: i) el nínxol ecològic ancestral del clade, ii) el punt inicial per la dispersió geogràfica, iii) les limitacions de dispersió degudes a altres espècies i condicions abiòtiques, entre d'altres (Wiens i Donoghue 2004). Amfibis i rèptils són organismes ideals per analitzar la biogeografia ja que les seves poblacions no han sofert extincions intenses i presenten una reduïda capacitat per superar les barreres marines. Les filogènies són una eina amb un ús a alça, ja que són molt útils en la reconstrucció de la història evolutiva de grups amb escàs registre fòssil (Pleguezuelos *et al.* 2008).

La història geològica, biogeogràfica, ecològica i també la història humana, han contribuït a la gran diversitat biològica i cultural que presenta la Mediterrània. La recerca ecològica i el descobriment d'espècies en aquesta regió han estat profundament revisades per destacats científics (Riedl, Margalef i Hofrichter, entre d'altres), sobretot la regió oest de la Mediterrània (Coll *et al.* 2010). El paisatge de diverses àrees de la Mediterrània (destacant el sud-est d'Espanya, Grècia i nord-Àfrica), indiquen que la interacció entre clima, topografia, característiques del sòl i l'activitat humana han conduït a curt i mig-termini a la no sostenibilitat. La presència d'un considerable nombre d'espècies endèmiques dificulta, després de pertorbacions, retornar a l'estat inicial o natural (García-Ruiz *et al.* 2013).

La biodiversitat global s'està veient dràsticament reduïda degut a nombrosos canvis en el medi, per tant, són necessàries noves estratègies per la conservació de la biodiversitat (Posadas *et al.* 2006). Aquesta disminució té una causa antropogènica molt important, ja que ha provocat l'alteració de la composició atmosfèrica, el clima, els usos del sol; a més d'incrementar l'intercanvi biològic, a través del comerç o la introducció deliberada d'espècies a nous territoris. Tot això ha produït uns nous esdeveniments, en definitiva, nous patrons en la distribució d'espècies.



Figura 1. Regió Mediterrània. Font: Hofrichter (2004).

Aquests canvis en la biodiversitat afectaran biomes i ecosistemes, i la biogeografia pot representar una ajuda important per afrontar els problemes de conservació més dramàtics (Crisci *et al.* 2006). Algunes de les noves estratègies, des d'un punt de vista biogeogràfic, haurien de centrar-se en on han viscut les espècies, on viuen i on viuran en el futur. La conservació de biodiversitat implica diverses disciplines, com la biologia sistemàtica, la geografia o la geologia (Posadas *et al.* 2006). Però cal destacar els avantatges de la integració de l'ecologia i la història (base de la biogeografia) per assegurar l'eficàcia dels esforços de conservació.

A les darreres dues dècades, alguns científics s'han centrat en la selecció de *hotspots* com a punts calents de conservació. Els *hotspots* són àrees amb una concentració excepcional d'espècies endèmiques i que experimenten una pèrdua d'hàbitat important. La seva composició i l'evolució de les espècies d'aquestes regions van lligades a la seva complexa història geològica (Pleguezuelos *et al.* 2008). La combinació única de factors geològics i climàtics a la Mediterrània ha causat el desenvolupament d'una biota altament diversa i característica, tal com es demostra amb la inclusió de la Mediterrània occidental com un dels 25 *hotspots* de biodiversitat mundial més importants (Myers *et al.* 2000). L'oest de la Conca Mediterrània, amb una edat aproximada d'uns 30 milions d'anys (Ma), inclou nombroses espècies endèmiques, degut principalment a successos repetitius d'aïllament i connexió d'àrees insulars i continentals. Una característica important és la seva heterogeneïtat geogràfica i ambiental a tots els nivells, des de les més locals a les més regionals (Sfenthourakis i Svenning 2011).

La Mediterrània (Figura 1) es troba entre dos grans continents: Europa i Àfrica. És una mar semitancada que té costa a tres continents (Europa, Àfrica i Àsia) i banya 24 països; la qual connecta a través de l'Estret de Gibraltar, amb l'oceà Atlàntic i, a través de l'Estret de Dardanels, la Mar Màrmara i la Mar Negra. Consta d'una superfície marina d'uns 2.500.000 km² i una línia costanera de 46.500 km, del quals, 24.600 km són d'11.879 illes de la Mediterrània (Sfenthourakis i Svenning 2011). Segons Blondel *et al.* (2010), la regió terrestre de la Mediterrània està formada per uns 2.300.00 km². En

aquesta regió cal destacar la presència humana des de fa milers d'anys, i especialment la d'importants civilitzacions durant els darrers 5.000 anys (Sfenthourakis i Svenning 2011).

El seu origen geològic (**Figura 2**) començà fa uns 200 Ma al Mesozoic, període en què Pangea es va començar a dividir en dos grans continents: Gondwana (estava formada pel que ara és Amèrica del Sud, Àfrica, Austràlia, l'Índia i l'Antàrtida) i Lauràsia (hi pertanyien els territoris d'Amèrica del nord, Europa i Àsia). Encara que, la seva formació es data de fa uns 65 Ma degut a la convergència de les plaques africana i europea; fet que provocà la contracció del seu precursor, l'oceà Tetis (Mannion i Vogiatzakis 2007; Blondel *et al.* 2010). La geografia característica de la Mediterrània ha estat marcada, des del Cretàc Posterior, per diversos moviments en la deriva dels continents, principalment per Àfrica i Europa (Gueguen *et al.* 1998). Però sobretot, cal remarcar la intensa activitat a finals del Cretàc Posterior degut als moviments de les plaques tectòniques: l'europea i africana, i en menor mesura, també a l'àrabi (Sfenthourakis i Svenning 2011).

El moviment convergent d'Àfrica en direcció a Euràsia, juntament amb moviments rotatoris de petits blocs terrestres derivats dels grans blocs continentals, van reduir la mida del Mar Tetis. Els processos que han originat l'actual Mar Mediterrània són deguts a desplaçaments dinàmics i continus tant de les petites com de les grans plaques tectòniques, que derivaren en la formació de cadenes de muntanyes, conques marines, foses oceàniques i arxipèlags (Hofrichter 2004). La majoria de dades paleogeogràfiques de l'oest de la Mediterrània indiquen que es va formar l'Estret de Gibraltar a principis del Pliocè. I durant el Miocè Tardà, existiren almanco dues connexions més entre l'Atlàntic i la Mediterrània. La primera a través del sud d'Espanya pel corredor bètic i l'altra pel corredor rifení situat al nord del Marroc (Krijgsman 2002).

Durant l'Oligocè, l'àrea entre la Península Ibèrica i el sud de França estava formada per uns territoris que actualment es troben situats a centenars de kilòmetres de distància. Entre aquestes regions trobem la serralada bètic-rifenya, les Illes Balears, les Cabílies, Calàbria, Còrsega i Sardenya (Rosenbaum *et al.* 2002).

Segons Krijgsman (2002), fa uns 30 Ma, succeïren dos esdeveniments que tingueren un paper destacat en la formació i obertura de la Mediterrània occidental i central, que la modularen fins a tenir una conformació molt similar a l'actual. Els episodis que conduïren a l'aparició de noves conques, que migraven de l'oest cap a l'est (Gueguen *et al.* 1998) foren: i) l'obertura de la Conca Balear o Alger-Provençal juntament amb la rotació del bloc de Còrsega i Sardenya (rotació que es creu acabà fa uns 16 Ma) i ii) un desplaçament que va provocar l'obertura de la Conca Tirrena. Durant l'Oligocè Superior es va produir la rotació de la Península Ibèrica a causa de nous moviments d'Àfrica (Blondel i Aronson 1999; Blondel *et al.* 2010).

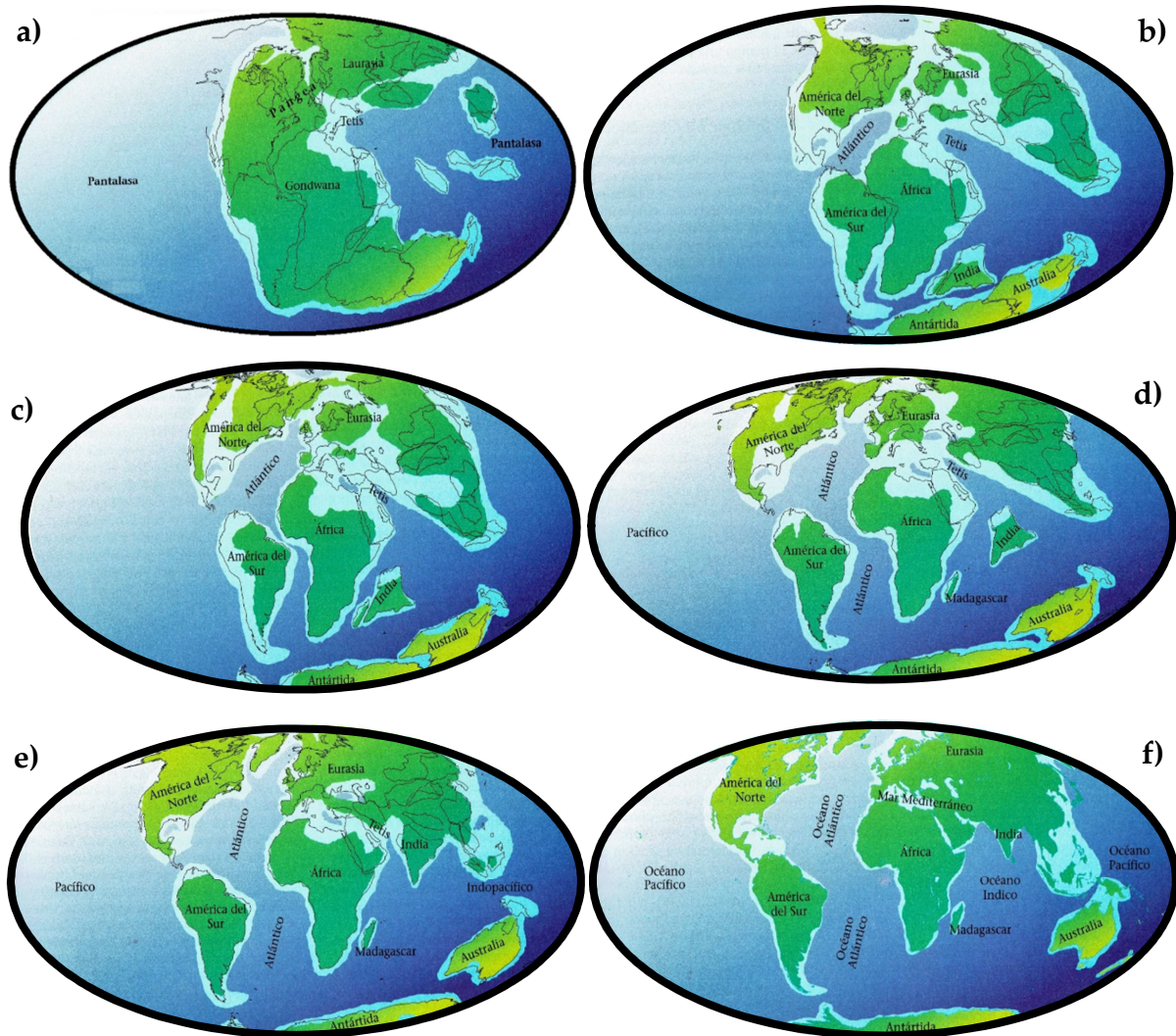


Figura 2. Evolució i desplaçaments dels continents que afectaren a la formació de la Mar Mediterrània: a) fa 210 Ma durant el Triàsic, b) fa 120 Ma durant el Juràssic, c) fa 90 Ma al Cretàic, d) fa 60 Ma al Paleocè, e) fa 30 Ma a l'Oligocè i f) l'actualitat. Font: modificat de Hofrichter (2004).

Fa entre 30 i 28 Ma (**Figura 3**), va començar a girar la microplaca de Còrsega i Sardenya, en sentit contrari a les agulles del rellotge respecte a Europa (Álvarez 1972, 1974; Rosenbaum *et al.* 2002; Meulenkamp i Sissingh 2003; Advokaat *et al.* 2014). Durant el Burdigalià (Miocè Inferior) també es forma l'àrea Tirrena i les rotacions dels blocs continentals van afavorir el trencament de l'arc que connectava les Illes Balears amb Sardenya (Gueguen *et al.* 1998). Mentre que les Illes Balears i la Gran Cabília (actualment nord d'Algèria) se separen, també tenen una rotació, però en el mateix sentit de les agulles del rellotge (Schettino i Turco 2006). Els diferents moviments d'aquestes microplaques van provocar canvis continentals (com la creació de la Conca Balear). Durant aquests moviments també es va produir la separació entre la Gran Cabília i el promontori balear. I progressivament, totes les microplaques es van desplaçar fins a la seva posició actual (Blondel i Aronson 1999).

| ERA | PERÍODE | ÈPOCA | Edat (Ma) |
|----------|------------|----------|-----------|
| CENOZOIC | Quaternari | Holocè | 0,01 |
| | | Plistocè | 2,59 |
| | Neogen | Pliocè | 5,33 |
| | | Miocè | 23,03 |
| | Paleogen | Oligocè | 33,90 |
| | | Eocè | 56,00 |
| Paleocè | | 66,00 | |
| MESOZOIC | Cretaci | Superior | 100,50 |
| | | Inferior | 145,00 |
| | Juràssic | Superior | 163,50 |
| | | Mitjà | 174,10 |
| | | Inferior | 201,30 |
| | Triàsic | Superior | 237,00 |
| | | Mitjà | 247,20 |
| | | Inferior | 252,17 |

Figura 3. Escala temporal obtinguda a partir de les dades de la Taula Cronostratigràfica Internacional del 2013. Fonts: IUGS (*International Union of Geological Sciences*) i IGC (Institut Geològic de Catalunya).

Posteriorment, les Cabílies es desplacen cap a Àfrica i s'adhereixen a ella (18-15 Ma) (Schettino i Turco 2006). Per una altra banda, s'ha format el Mar d'Alboran i l'estret de Gibraltar (fa aproximadament 10 Ma), gràcies als moviments del bloc bètic-rifeny, del qual s'uneix una part a la Península Ibèrica i l'altra a Àfrica (Rosenbaum *et al.* 2002). Això significa que fa uns 10 Ma, la Conca Provençal, la depressió de València i la Conca del nord d'Algèria estaven quasi totalment obertes (Gueguen *et al.* 1998). Cal destacar que durant el Miocè Superior, les Illes Balears van estar en contacte amb el continent (Mannion i Vogiatzakis 2007). Fa uns 9 Ma durant el Tortonià, va començar la formació del Mar Tirrè, la conca més jove de la Mediterrània occidental en dues etapes: la primera amb l'obertura de la zona nord fa devers 9-5 Ma i una segona, fa 5-0 Ma on es va obrir la regió sud (Rosenbaum *et al.* 2002). En aquest procés el bloc de Còrsega i Sardenya gira i es desplaça, mantenint la unió amb el continent; unió que es perd en finalitzar la migració/rotació i amb la separació del bloc en dos (Còrsega i Sardenya) fa devers 9 Ma (Álvarez 1972, 1974) (**Figura 4**).

Per resumir l'explicació anterior podem posar de manifest que la paleogeografia d'aquesta regió és molt complexa (Sfenthourakis i Svenning 2011), que té una història geològica molt variada que inclou canvis dràstics que afectaren el clima, el nivell de la mar i la salinitat. Cal destacar el paper de la Crisi Messiniana (MSC, de *Messinian Salinity Crisis*) moment en què va tenir lloc el seu aïllament de l'Atlàntic, i que va provocar el seu quasi assecament total a finals del Miocè (Mannion i Vogiatzakis 2007). És coneguda per ser un dels episodis més dramàtics en el canvi de les condicions oceàniques durant el Neogen (Krijgsman 2002), la qual cosa afectà a una important regió amb una extensió d'uns 2,5 milions de km². La Crisi Messiniana, endemés, va tenir uns efectes globals importants que trastocaren el clima, el paisatge de la Mediterrània i de les regions contigües, així com també a l'evolució i la distribució de la flora i la fauna (Hsü *et al.* 1977).

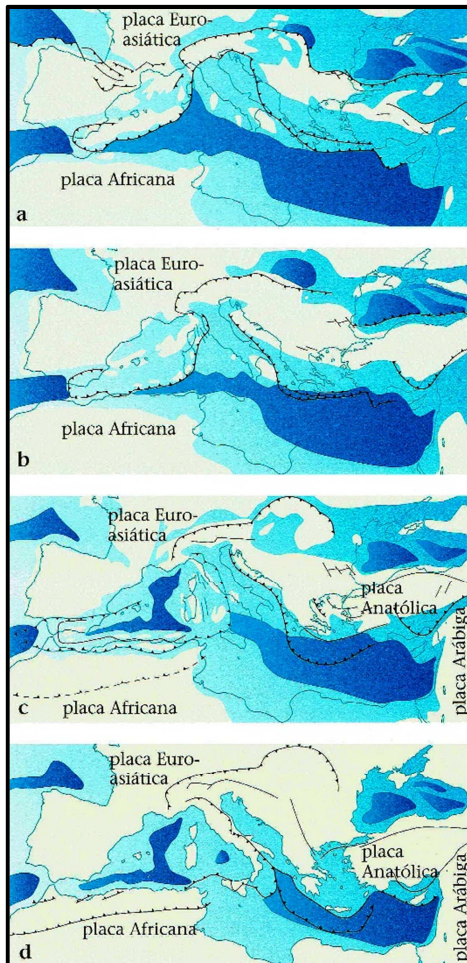


Figura 4. Evolució de la regió mediterrània de l'Eocè superior fins a l'actualitat.

Blau clar: plataforma i talús continental, escorça continental. Blau obscur: fons abissal mesozoic amb escorça oceànica.

- Eocè Superior (fa 35 Ma): al final de l'Eocè a la Mediterrània només existia escorça oceànica mesozoica molt antiga. Durant l'Oligocè i el Miocè, aquesta escorça es va consumir en la seva totalitat i la Mediterrània occidental també va sofrir una important reducció.
- Miocè Inferior (fa 22 Ma): L'Egeu i la Mediterrània occidental estaven en expansió. A la Conca Liguro-Provençal es va formar una nova escorça tectònica i al Mar d'Alboran es formà un conca d'expansió.
- Miocè Superior (fa 10 Ma): La rotació del bloc Còrsega-Sardenya ja havia finalitzat i s'havien desenvolupat les Conques Liguro-Provençal i la Balear. En la regió tirrena aparegué un procés d'extensió.
- Època actual: A l'est de Sardenya es va formar una nova conca, el Mar Tirrè.

Font: Hofrichter (2004).

Durant la MSC es va tancar l'estret de Gibraltar, i independentment del debat que hi ha amb la velocitat del procés o amb les diferents explicacions del tancament, l'important és que la major part de la Mar Mediterrània es va assecar (Mannion i Vogiatzakis 2007). Segons Cavazza i Wezel (2003), la convergència de les plaques africana i europea, juntament amb la disminució del nivell del mar, va tenir com a conseqüència que la Mar Mediterrània es quedés aïllada de l'oceà. Aquest fet va provocar la seva dessecació i la consegüent precipitació i acumulació d'un destacat volum de roques sedimentàries (com per exemple guix) a tota la Conca Mediterrània. Cal remarcar que aquest procés no es va produir en una única gran deposició, més bé eren grups de deposicions separades; totes elles diferents en forma i dimensions separades per barreres locals, que arribaren a crear una capa d'entre 300-500 metres de gruix (Hsü *et al.* 1977).

Segons Hofrichter (2004), la MSC va tenir dues fases, la primera que va succeir fa entre 5,75-5,70 Ma durant la qual el nivell de la mar va descendir molt poc; i la segona fase (fa entre 5,60-5,33 Ma) en la que el nivell de la mar va descendir 1.500 m i la major part de la Conca Mediterrània es va assecar, separant la Mar Mediterrània de l'Atlàntic. Aquest assecament també va ser produït per la pèrdua d'aigua per evaporació.

Aquests canvis provocaren que el nombre de fílum es veies reduït considerablement, sobretot els que vivien en aigües profundes (Emig i Geistdoerfer 2004). La majoria d'espècies varen abandonar la Mediterrània dirigint-se a l'Atlàntic o van morir degut a l'elevada salinitat. Només unes poques espècies eurihalines sobrevisqueren a les altes concentracions de sal. Quan va començar el Pliocè la fauna emigrada va retornar, juntament amb altres espècies atlàntiques; a partir d'ambdós grups es va generar la fauna actual, la qual conté un elevat nombre d'endemismes (Hofrichter 2004). També cal remarcar que la majoria de gèneres i espècies d'aquella època formen part de la fauna actual de la Mediterrània, la qual cosa pareix una aparent incongruència sobre la que els experts plantegen diferents hipòtesis (per a més informació Emig i Geistdoerfer (2004)).

El procés va finalitzar al cap d'uns 600.000 anys amb la reobertura de l'Estret de Gibraltar la qual cosa provocà l'entrada d'aigua des de l'oceà atlàntic (Mannion i Vogiatzakis 2007).

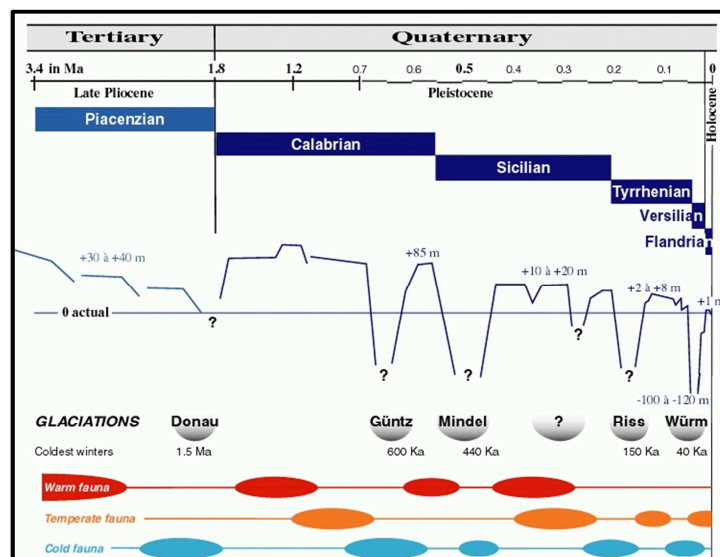


Figura 5. Representació de la variació del tipus de fauna i del nivell de la Mar Mediterrània durant el període glacial posterior al Pliocè. Font: Emig i Geistdoerfer (2004).

Després de la reobertura va començar l'anomenat període glacial o edat de gel (Figura 5) que pot fer pensar que va ser una època desfavorable per a la vida, però en realitat va tenir importants repercussions ecològiques (Hofrichter 2004). Va ser una època de gran inestabilitat climàtica amb períodes freds i d'altres càlids, corresponents a les èpoques glacials i interglacials (Mannion 1997, 1999); va estar formada per diversos episodis de sequera i inundacions, d'alta i baixa salinitat, i pujades i baixades del nivell de la mar. Els ecosistemes presents a la regió responien a cada un d'aquests processos climàtics cíclics (Mannion i Vogiatzakis 2007). L'època de les glaciacions es va anomenar Plistocè, la qual correspon a l'època més antiga del Quaternari, i va iniciar-se a Europa fa 2,5 Ma, i durà fins a la darrera glaciació, la de Würm, al principi de l'Holocè (època actual), fa uns 10.000 anys. Es creu que durant el Plistocè hi va



haver 17 períodes glacials amb un descens de la temperatura de 15 °C de mitjana a l'any (Hofrichter 2004). Les repetides congelacions i descongelacions del gel polar afectaven directament les regions costaneres provocant canvis en el nivell del mar de fins a 120 m; però també formaven i eliminaven ponts terrestres entre diversos territoris, com per exemple, entre Còrsega i Sardenya. Aquestes unions i, el consegüent aïllament, van tenir efectes notoris en la composició de la flora i la fauna illenca. Per a la història ambiental de les illes de la Mediterrània va tenir un especial interès l'inici de l'actual fase interglacial, l'Holocè. Entre fa 11.500 i 5.000 anys aparegué un nou colonitzador a totes les illes de la Mediterrània, l'espècie humana, el qual va transformar el territori i va introduir noves espècies, la qual cosa alterà els ecosistemes existents, i arribà en alguns casos a provocar l'extinció d'espècies natives (Mannion i Vogiatzakis 2007).

Totes les illes tenen trets similars, però al mateix temps cada una d'elles té característiques diferencials, fet que trobem arreu del món, i com no podia ser d'altra manera, també a la Mediterrània. Les illes són fragments de terra envoltats d'aigua, essent el seu aïllament, el principal factor limitant de recursos. També són un sistema tancat, que difereix totalment de la continuïtat que presenten els continents, per tant, les illes poden ser considerades laboratoris naturals. La Mediterrània compta amb un conjunt nombrós d'illes de molt variades mides i amb característiques que les fan úniques (**Taula 1**). Per aquesta raó, globalment són considerades *hotspots* de biodiversitat (Davis *et al.* 1994; Médail i Quézel 1997). La insularitat va lligada a una alta biodiversitat, la qual cosa remarca el paper que tenen les illes com a refugis i l'adaptació que mostren les espècies als ambients característics de cada una d'elles (Mannion i Vogiatzakis 2007).

Taula 1. Extensió d'algunes illes de la Mediterrània occidental. Modificat de Vilà-Valentí *et al.* (2000).

| Illes Balears | | | Altres illes | |
|---------------|--------------------------|----------|--------------|--------------------------|
| Illa | Extensió km ² | Km costa | Illa | Extensió km ² |
| Mallorca | 3.640,16 | 461 | Còrsega | 8.682 |
| Menorca | 701,84 | 216 | Sardenya | 24.089 |
| Eivissa | 541,22 | 170 | Sicília | 25.708 |
| Formentera | 82,08 | 68 | | |
| Cabrera | 15,70 | 22 | | |
| Altres illes | 33,00 | | | |
| TOTAL | 5.014,00 | | | |

En general la fauna de les illes mediterrànies és similar a la que trobem als territoris continentals més propers. Les principals similituds es troben en els amfibis i els rèptils que tenen gran semblança amb els europeus, especialment a les illes de l'oest (Mannion i Vogiatzakis 2007).

1.1.1. Arxipèlag balear

Les Illes Balears (**Figura 6**) estan formades per 151 illes i petites illes, més un gran nombre d'illots, malgrat aquest elevat nombre d'illes podem destacar que les illes de Mallorca, Menorca, Eivissa i Formentera, representen més del 99 % del total de la superfície i sumen una àrea d'uns 5.061 km² i una costa de 1.238,9 km (Mannion i Vogiatzakis 2007). Mallorca, Menorca i l'arxipèlag de Cabrera es coneixen com les Gimnèsies i, les Pitiüses engloben Eivissa i Formentera. A una distància de 150 km de mitjana (entre un mínim de 50 km i un màxim de 240 km), s'hi troba el continent (Morey i Ruiz-Pérez 2008).



Figura 6. Arxipèlag balear: situació geogràfica i les principals illes que el conformen. Font: Terrasa (2009).

El promontori de les Illes Balears és un dels trets més característics de la Conca Mediterrània i compta amb una història tectònica molt complexa. El promontori té una longitud de 348 km, una amplada de 105 km i s'eleva entre 1.000 i 2.000 m per sobre les conques marines que l'envolten. A més, es caracteritza per estar format per dos grans blocs: el de l'est amb una profunditat màxima de 200 m format per Mallorca i Menorca i el de l'oest, d'una mida més reduïda i amb una profunditat de fins a 800 m, està format per Eivissa i Formentera (Acosta *et al.* 2003).

De les Illes Gimnèsies (**Figura 7**) podem remarcar que Mallorca és l'illa més gran de les Illes Balears (amb una superfície de 3.640 km²) i està envoltada per diverses illes i illots, que solen ser prolongacions de les dues estructures muntanyoses presents a Mallorca: i) de la Serra de Tramuntana, situada al nord i amb el Puig Major com el cim més alt (1.435 m), a la regió sud-oest de la qual trobem sa Dragonera (la més gran de totes les illes), els Malgrats, el Toro, sa Porrassa; i al nord trobem es Colomer; i ii) de les Serres de Llevant, destacarem l'arxipèlag de Cabrera, na Guàrdia, na Moltona, na Pelada i es Caragol.

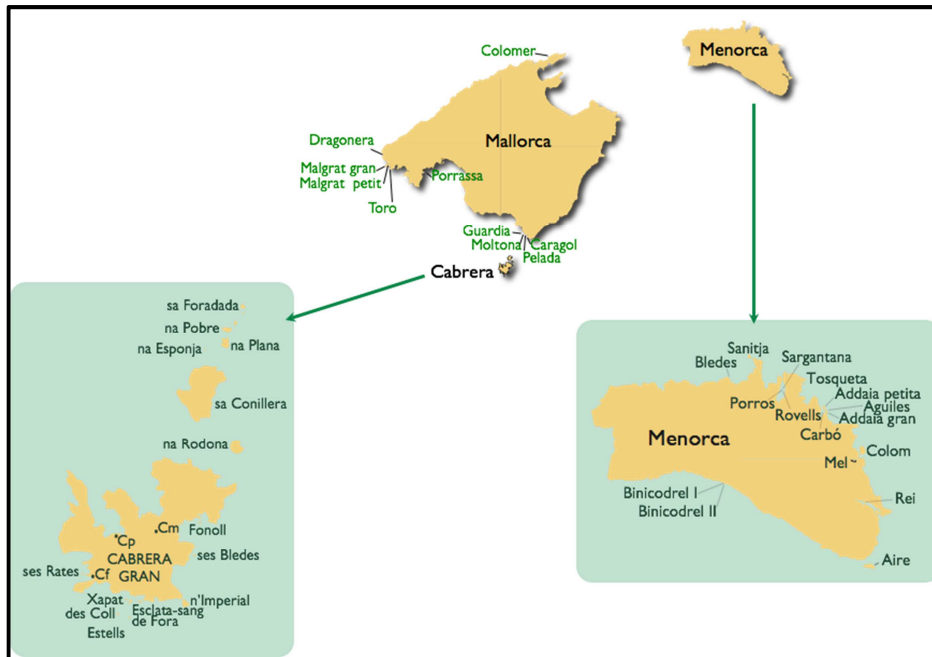


Figura 7. Principals illes i illots que formen part de les Gimnèsies. Font: modificat de Terrasa (2009).

Per una altra banda, Menorca, que va ser declarada Reserva de la Biosfera el 1993, és l'illa més oriental i té una extensió d'uns 701,84 km². De les illes i illots que l'envolten cal comentar que la majoria estan situats a ports o badies, sobretot a la regió de Tramuntana. A la badia de Fornells destaquen: Sargantana, Rovells i Porros, i a l'est de la mola de Fornells, l'illa de'n Torqueta; a la badia d'Addaia: les illes d'Addaia gran i petita, es Carbó i ses Àguiles; al port de Maó: l'illa del Rei; a l'albufera des Grau: Mel i Colom; a Tramuntana, hi ha les illes Bledes i, a l'extrem de la península de Cavalleria, Sanitja; a la regió de migjorn només hi ha l'illa de l'Aire i els illots de Binicodrell (Terrasa 2009).

L'arxipèlag de Cabrera està format per Cabrera Gran i 18 illes i illots més. La primera illa que ens trobem arribant a l'arxipèlag és na Foradada (la més septentrional), la segueixen na Pobra i na Plana, Esponja, Conillera (o l'illa des Conills) i Redona situada a l'est. Prop de la costa de Cabrera Gran hi trobem tota una sèrie d'esculls i illots, comentarem els més grans: l'illa de ses Rates (al sud-est de Cabrera Gran), l'illa des Fonoll, l'illot de ses Bledes, i n'Imperial. A la costa més meridional de Cabrera Gran hi localitzem els Estells, illots de dimensions reduïdes: l'Estell de s'Esclatasang i l'Estell xapat són els que estan situats més a prop de Cabrera gran, i l'Estell des Coll i l'Estell de Fora són els més allunyats.

Les Pitiüses, a més d'estar formades per Eivissa i Formentera, tenen un considerable nombre d'illes més petites, illots i esculls al seu voltant. S'ha de destacar el conjunt d'illes que uneixen Eivissa i Formentera (**Figura 8**) des de la punta de ses Portes a la des Borronar i Trucadors: es Caragoler, sa Barqueta, illes Negres, es Penjats, es Porcs, s'Espalmador, sa Torreta, s'Espardell i s'Espardelló. A més a més, trobem un altre conjunt d'illots a la Badia de Sant Antoni de Portmany: sa Conillera, illes des Bosc,

s'Espartar i ses Bledes. A la badia d'Eivissa, les antigues illes unides avui a terra ferma, formen part del port: illes Plana, Grossa i es Botafoc. L'illa més elevada està situada, enfront de la punta des Savinar o l'Oliva (al sud-oest d'Eivissa) i és es Vedrà (amb una altura de 381 m); al seu costat es troba es Vedranell. I la més gran de l'extrem oriental és l'illa de Tagomago, enfront des cap Roig (Vilà-Valentí *et al.* 2000). Es Vedrà i es Vedranell (**Figura 9**) formen una reserva natural, però a més també trobem la reserva natural dels illots de Ponent, que està formada per: sa Conillera, l'illa des Bosc, s'Espartar i ses Bledes (na Gorra, es Vaixell, na Bosc, Bleda Plana, Esculls de Tramuntana, Escull vermell i els illots dels Esculls d'en Ramon) (**Figura 10**).

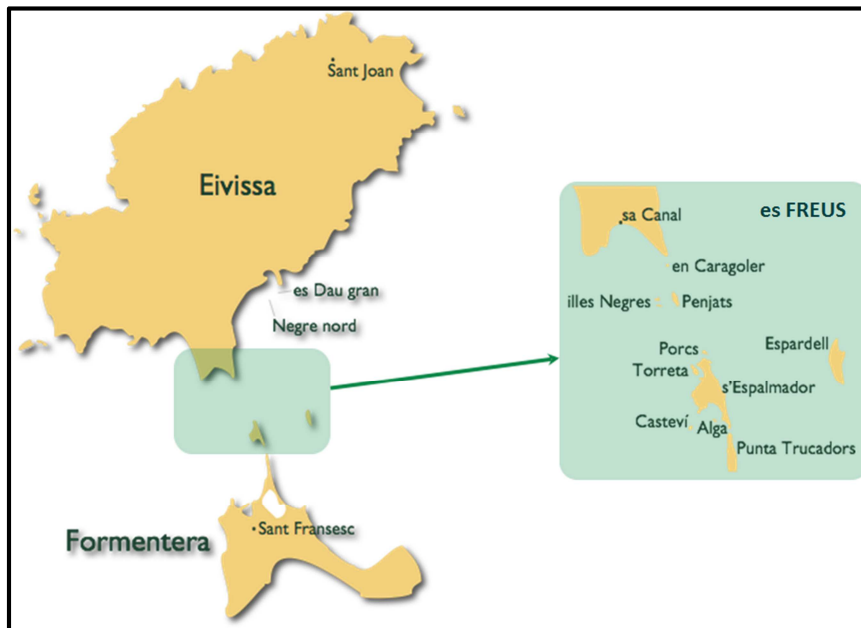


Figura 8. Illes que es troben a l'estret des Freus, el qual separa Eivissa i Formentera. Font: modificat de Terrasa (2009).



Figura 9. Es Vedranell i es Vedrà (Eivissa). Fotografia: Joana M. Buades.

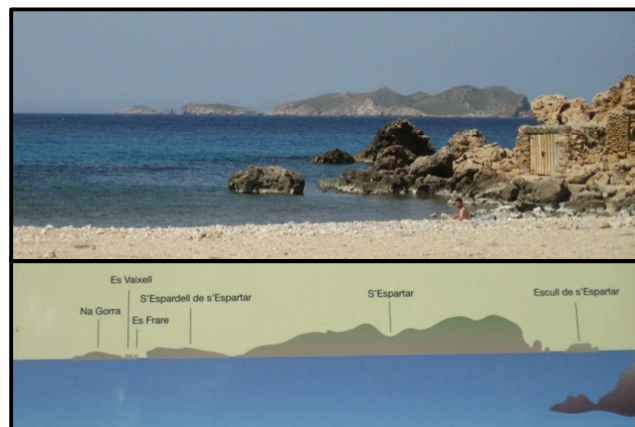


Figura 10. Grup d' illes d'Eivissa. Fotografies: Joana M. Buades.



A les Illes Balears, per la seva riquesa biològica i per la seva gran fragilitat estructural i funcional, qualsevol tipus d'impacte mediambiental, es magnifica considerablement. Avui en dia, aproximadament un 40 % del seu territori està protegit sota normativa legal com a Àrea Natural d'Espècial Interès (ANEI) o Àrea Rural d'Interès Paisatgístic (ARIP); i Menorca està declarada Reserva de la Biosfera (Mannion i Vogiatzakis 2007).

1.2. FAMÍLIA LACERTIDAE: GÈNERE *PODARCIS*

La família Lacertidae (Oppel 1811) es troba àmpliament distribuïda per tota Europa, Àsia i Àfrica (Arnold *et al.* 2007). A Europa la seva aparició s'ha datat fa devers 50 Ma (durant l'Eocè Inferior). Aquesta família inclou entre 24 i 30 gèneres i compta amb unes 300 espècies; tots els organismes inclosos presenten uns trets característics (presència d'orifici a la regió supratemporal del crani, zona de les parpelles ossificada, presència de làmines òssies d'ós dèrmic, cinc dits a cada extremitat i capacitat d'autotomia, entre d'altres) (Pérez-Mellado 2009; Terrasa 2009). També presenten dimorfisme sexual, ja que els mascles són més grans, tenen un cap més ample i uns músculs mandibulars més desenvolupats, juntament amb uns porus femorals molt més aparents (orificis presents a l'interior de les cuixes, responsables de la segregació d'hormones) (Terrasa 2009).

A la regió mediterrània aquesta família està representada per 14 gèneres. Les relacions filogenètiques entre els quals, encara no es coneixen bé. A les Illes Balears hi ha representats dos gèneres de lacèrtids: *Podarcis* i *Scelaris*. Les espècies *Scelaris perspillata* i *Podarcis sicula* foren introduïdes pels humans només a l'illa de Menorca, mentre que podem trobar les dues espècies endèmiques *Podarcis lilfordi* i *Podarcis pityusensis* a la majoria d'illes petites i illots de l'arxipèlag Balear (Pérez-Mellado 2009).

El gènere *Podarcis* (Wagler 1830) és el grup de rèptils escatosos que ha evolucionat i s'ha diversificat a la Conca Mediterrània (**Figura 11**). Destacarem que, aquest gènere, inclou diverses espècies endèmiques d'illes de la Mediterrània (Oliverio *et al.* 2000). El seu territori abasta des de l'Europa central al Sàhara, i de la Península Ibèrica a Crimea. És el més divers de tots els grups de rèptils del sud d'Europa (Harris i Arnold 1999) i no fou acceptat com a gènere fins a l'any 1973 quan Arnold va fer la seva revalidació morfològica. Així les espècies de *Podarcis* es caracteritzen per la presència d'un orifici en forma de cor a l'estèrnium i a les vèrtebres autotòmiques (Arnold *et al.* 2007).



Figura 11. Distribució, en color fosc, de *Podarcis* a la Conca Mediterrània. Font: Carretero (2008) amb petites modificacions.

Actualment, dins el gènere *Podarcis* es coneixen dinou espècies, de les quals, tal i com s'ha esmentat abans, només *Podarcis lilfordi* i *Podarcis pityusensis* es troben, de forma autòctona, a les Illes Balears. La gran variabilitat intraespecífica i la reduïda variabilitat interespecífica fan difícil establir relacions filogenètiques i classificacions dins el gènere *Podarcis* (Terrasa 2009). La plasticitat d'aquestes espècies per adaptar-se al medi on viuen és observable en l'espectacular diversitat fenotípica de les poblacions d'aquests llinatges (morfologia, mida, color, etc.). Quant a la coloració, a les diferents illes i illots trobem poblacions totalment melàniques, no melàniques, d'altres uniformement verdes o marrons, inclús coloracions intermèdies, essent avui en dia, una incògnita el mecanisme que produeix aquesta gran diversitat de coloració (Terrasa *et al.* 2009) (**Figura 12**).



Figura 12. Coloracions de diverses poblacions de sargantanes: A) Individu melànic de *P. lilfordi* de l'Aire, B) Sardenya (*P. tiliguerta*), C) Addaia (*P. lilfordi*), D) Dragonera (*P. lilfordi*), E) La Mola (*P. pityusensis*), F) Espalmador (*P. pityusensis*), G) Eivissa (*P. pityusensis*), H) Cabrera (*P. lilfordi*). Fotografies: Bàrbara Terrasa (A-F), Joana F. Ferragut (G) i Iris Alemany (H).

1.2.1. Les sargantanes insulars: *Podarcis lilfordi*, *Podarcis pityusensis* i *Podarcis tiliguerta*

Les sargantanes, juntament amb les serps, són els vertebrats terrestres no voladors més comuns a les illes. A algunes de les illes més grans i més densament poblades pels humans, aquestes espècies han desaparegut, com per exemple seria el cas de *P. lilfordi*, que s'ha extingit de les illes de Mallorca i Menorca, però que sí es troba a illes més petites i a illots del seu voltant. Els lacèrtids es caracteritzen per la seva facilitat de colonitzar illes, gràcies a la seva capacitat adaptativa; s'han descrit alguns casos que primerament eren insectívors i que, posteriorment, s'han observat que a les illes eren herbívors, ja que s'alimentaven de nèctar, pol·len i fruits. En els darrers anys l'existència d'alguns grups taxonòmics insulars han centrat l'interès, passant de tenir una explicació purament de vicariança a tenir en compte el paper destacat que hi té la dispersió. No només s'ha de valorar la capacitat de dispersió que tenen els lacèrtids, també s'ha de tenir en compte el paper que tenen els humans en la translocació d'individus d'una illa a una altra (Vences 2009).

Estudis filogenètics basats en marcadors moleculars (gens nuclears i mitocondrials) i la història biogeogràfica de les espècies i les illes on habiten, ens permetran crear un fil conductor per entendre la seva evolució. L'ancestre comú de les espècies germanes *P. lilfordi* i *P. pityusensis* es va originar durant la MSC (fa entre 5,95-5,33 Ma) (Brown *et al.* 2008), moment que va afectar a la mar Mediterrània degut a la seva quasi total dessecació. La reobertura de l'Estret de Gibraltar va provocar una nova entrada d'aigua des de l'Atlàntic la qual cosa provocà la separació dels dos grans grups: les Gimnèsies i les Pitiüses. Fet que va provocar l'inici de la separació de la sargantana endèmica de les Balears en les dues espècies, *P. lilfordi* i *P. pityusensis*, ja que durant l'època de les glaciacions els canvis del nivell de la mar no van tornar a unir els dos grans grups (separats per una profunditat de més de 600 m). Malgrat això, la resta d'illes i illots sí que sofriren processos de connexió i desconnexió, ja que els canals que les separaven eren menys profunds; se sap que el més profund separava Mallorca de Menorca i era d'uns 70 m, la resta de canals eren inferiors a 10 m. Estudis filogenètics preliminars (Terrasa *et al.* 2004) basats en ADN mitocondrial (ADNmt), més concretament en el gen citocrom b (*Cytb*), indicaren que els individus de cada espècie formaven un grup monofilètic i que la separació dels ancestres d'ambdues espècies s'hauria produït fa uns 4,95 Ma; per tant, coincidiria amb les dades geològiques anteriors que daten la separació dels dos grans blocs d'illes en 5 Ma.

Les sargantanes balears han evolucionat a la vegada que la geologia insular, fins al punt que les poblacions de les Illes Balears han originat en cada illa formes diferents; les quals sovint s'han descrit com a subespècies a causa de la gran variació en les característiques en folidosi i en coloració.



1.2.1.1. *Podarcis lilfordi*

Aquesta espècie, fou descrita per Günther al 1874 i se n'han identificat un nombre variable de subespècies, encara que actualment se'n solen acceptar 25 (Pérez-Mellado i Salvador 1988; Pérez-Mellado 2005). La sargantana balear està catalogada com a En Perill (*Endangered* - EN) a nivell internacional i nacional (segons l'*International Union for the Conservation of the Nature* (IUCN) i el *Libro rojo de los vertebrados de España*, respectivament); i, Vulnerable (VU), segons la Llista vermella d'espècies amenaçades de les Balears. Es classifica com a vulnerable ja que la supervivència de les poblacions no està assegurada degut a diverses agressions externes com la sobreexplotació o destrucció del seu hàbitat, entre d'altres. Segons Pérez-Mellado (2004), les principals amenaces són: la translocació i captura d'individus per part de l'home, la reduïda població efectiva d'alguns illots i la destrucció de vegetació, entre d'altres. Entre els seus principals depredadors trobem la geneta (*Genetta genetta*), l'eriç (*Atelerix algirus*) i els moixos assilvestrats.

Destaca la seva dieta omnívora, ja que s'alimenta de qualsevol tipus d'animal i/o vegetal que troba, depenent de cada època de l'any (la disponibilitat d'aliments en illes petites pot ser molt minsa i variable, per això, s'adapta en funció de l'estació). De la dieta animal destaquen les formigues o els homòpters, i inclús isòpodes marins del gènere *Ligia* que arriben a las costes dels illots. La seva dieta també té una part vegetal (fulles, flors, nèctar, pol·len i fruits). S'ha comprovat que aquestes sargantanes tenen una notòria capacitat de discriminar vomerolfativament, és a dir, que a través de les protrusions linguals i l'òrgan de Jacobson, poden discriminar diversos tipus de plantes i animals, a la vegada també detecten alguns components tòxics vegetals com la quinina o la saponina, i eviten, així, el seu consum.

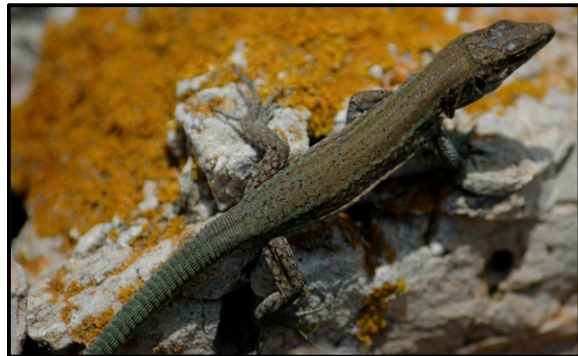


Figura 13. Sargantana d'Addaia (Menorca).
Fotografia: Bàrbara Terrasa.

Morfològicament l'espècie és de constitució robusta i amb un morro, normalment, molt punxegut (**Figura 13**). El dimorfisme sexual present fa que els mascles tinguin una major longitud (cap-cos), amb una mitjana d'aproximadament 81 mm, enfront als 75 mm de les femelles. Aquestes, mostren un menor nombre de porus femorals i un inferior nombre d'escames dorsals. La seva gran varietat de coloració, fa que trobem individus marró clar i d'altres totalment negres o melànics (Pérez-Mellado 1998a; Salvador 2009).

Podarcis lilfordi (**Figura 14**) és l'espècie que habita les Gimnèsies (formades per Mallorca, Menorca, Cabrera i les illes més petites i els illots que les envolten). Actualment, s'ha extingit de les dues grans illes de Mallorca i Menorca, segurament a causa de la presència humana (Terrasa *et al.* 2009); sols la podem trobar a 12 illes o illots costaners de l'illa de Mallorca i a unes 16 illes o illots propers a la costa de Menorca. Aquestes poblacions juntament amb la presència de les poblacions a

l'arxipèlag de Cabrera (a tots els seus illots i a l'illa gran) donarien un total de 43 poblacions de la sargantana balear, *Podarcis lilfordi* (Pérez-Mellado *et al.* 2008).

Dels estudis filogenètics recents és interessant destacar el dut a terme per Brown *et al.* (2008) basat en 29 poblacions de *Podarcis* de les Illes Balears utilitzant seqüències d'ADNmt i un gen nuclear (*C-mos*), amb un total de 2.675 parells de bases (pb). En aquest treball es descriuen els principals clades de la sargantana balear i es data la seva separació en base a la finalització de la MSC, i el consegüent reompliment de la Mediterrània. L'estudi indica que la separació de *P. lilfordi* i *P. pityusensis* es va produir fa entre 5.33-5.32 Ma, com ja s'ha indicat anteriorment, i com la sargantana balear s'estructura en diversos clades. Les dades mostren 2 grups (Eivissa i Formentera) dins l'espècie *P. pityusensis*, mentre que es diferenciaven (Menorca, Mallorca oest, Mallorca Sud, Cabrera Nord i Cabrera Sud a *P. lilfordi*.



Figura 14. Sargantana de Cabrera.
Fotografia: Iris Alemany.

Treballs posteriors varen aprofundir en la filogeografia i la diversitat genètica de cada una de les espècies per separat. En el cas de *P. lilfordi*, poc després de l'estudi anterior es va publicar Terrasa *et al.* (2009), el qual es va realitzar a partir de seqüències d'ADNmt (quasi 2.400 pb) en 118 individus de 43 poblacions d'aquesta espècie. Tal i com ja es va observar a Brown *et al.* (2008) es van obtenir 4 grups diferenciats genèticament: i) totes les poblacions de Menorca formarien un grup monofilètic i és el grup més primitiu de l'espècie (es pot situar la separació a final del Pliocè fa entre 2,6 i 2,8 Ma); ii) format exclusivament per les poblacions de les illes de l'oest de Mallorca (Dragonera, Malgrats i el Toro) i és lleugerament més recent que l'anterior, fa uns 2,0-2,3 Ma; iii) format per les poblacions de Cabrera i del sud de Cabrera i iv) corresponent a algunes poblacions del nord de Cabrera i el sud de Mallorca, amb una localització geogràfica menys clara i amb una separació d'ara fa 1,2 Ma (Brown *et al.* 2008, Terrasa *et al.* 2009) (**Figura 15**).

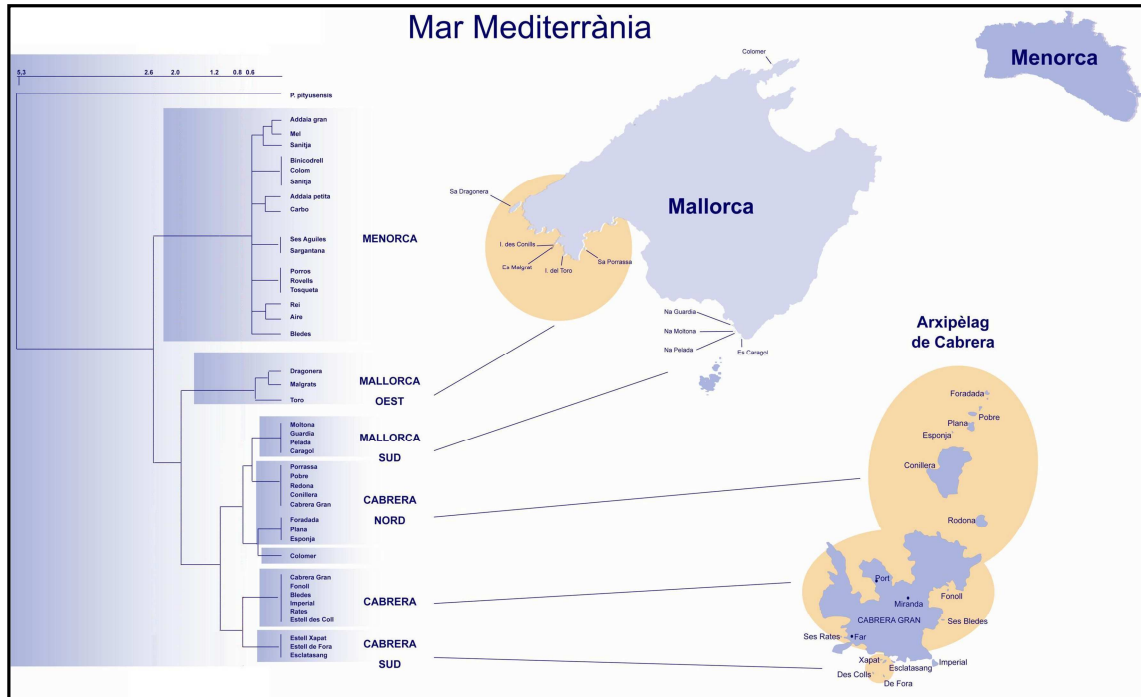


Figura 15. Distribució dels clades de *P. lilfordi*. Font: Terrasa (2009).

1.2.1.2. *Podarcis pityusensis* (Boscà 1883)

L'espècie fou descrita per Eduard Boscà i Casanoves. El nombre de subespècies no està clar, ja que varia en funció del criteri per definir subespècie, així i tot, destacarem que el valor més acceptat seria de 23 (Salvador i Pérez-Mellado 1984). A l'àmbit nacional, el *Libro rojo de los vertebrados de España* la té catalogada com a Rara (R), ja que es troba en hàbitats restringits o amb una distribució rara en una àrea més extensa; i a l'internacional, l'IUCN la té valorada com a Quasi Amençada - *Near Threatened* (NT).

Dins l'espècie es pot trobar una gran varietat morfològica, encara que totes tenen en comú que són sargantanes robustes, de cap alt i amb el morro arrodonit. Presenten dimorfisme sexual, ja que la llargària dels individus (caps) és major en mascles que en femelles, essent d'uns 96 mm i 83 mm, respectivament. A més, els mascles tenen un major nombre d'escames dorsals i de porus femorals (aquests darrers també estan molt més marcats) (Pérez-Mellado 1988).



Figura 16. Sargantana d'Espalmador. Fotografia: Bàrbara Terrasa.

Respecte a la coloració, algunes poblacions són per complet melàniques (de color negre uniforme), i altres exhibeixen tons dorsals verd brillant (**Figura 16**) o és dominant la coloració blau ultramar. La variabilitat morfològica no pareix correspondre's amb la variació detectada a les característiques genètiques de les sargantanes d'unes poblacions o unes altres. Alguns trets morfològics, com el melanisme, encara que s'han proposat diverses hipòtesis, tenen de moment molt difícil explicació (Pérez-Mellado 2009).

Els principals perills o amenaces per a les poblacions d'aquesta espècie són deguts a efectes antropomòrfics com l'alteració del seu hàbitat, les translocacions d'individus i la introducció de depredadors o competidors (Salvador 2009).

Diversos estudis sobre la seva alimentació indiquen una dieta omnívora, ja que s'aprofiten dels pocs recursos que tenen disponibles en funció de l'època de l'any. Poden alimentar-se a partir de diversos tipus d'invertebrats (com aràcnids, formícids, coleòpters i gasteròpodes), passant per components vegetals (nèctar, pol·len, flors, fulles, fruits o llavors) i inclús de restes d'animals marins que arriben a la vorera de la mar (Salvador 2009).

Aquesta espècie viu a les illes de Formentera i Eivissa (**Figura 17**), i a uns 42 illots propers a la seva costa. A més, aquesta espècie ha estat introduïda a diversos punts de Mallorca (a les muralles de la ciutat de Palma, a Illetes i a Cala Ratjada), juntament amb el cas de Dau Gran, illot d'Eivissa. A fora de les Balears es coneixen introduccions a la Península Ibèrica, com a la plaça de les Glòries a Barcelona i a Sant Joan de Gaztelugatxe a Biscaia (Pérez-Mellado 2009).



Figura 17. Sargantana d'Eivissa. Fotografia: Joana F. Ferragut.

En referència a la filogeografia de *P. pityusensis*, i la ja esmentada investigació realitzada per Brown *et al.* (2008), s'observa l'aparició de dos clades que correspondrien a l'illa d'Eivissa i l'altra a Formentera i les seves illes i illots, datant la seva separació en aproximadament fa 1 Ma. Posteriorment el treball de Rodríguez *et al.* (2013) es centra només en aquesta espècie a través de la recollida de 74 individus procedents de 37 localitzacions diferents. L'estudi basat en ADNmt (2.430 pb) i ADN nuclear (ADNn) (concretament 15 *Short Tandem Repeats* o STR) indica també la presència de dos principals clades/grups però en aquest cas es data la separació en fa uns 0.178 Ma durant el Plistocè Mitjà-Superior. Els grups detectats corresponen a: i) un clade format per les illes i illots adjacents a l'illa d'Eivissa, i ii) al compost per Formentera i les illes i illots que es troben als Freus. En canvi, les poblacions d'Eivissa varien de grup en funció del marcador genètic, essent segons l'ADNn més proper al grup format per les seves illes adjacents; i segons l'ADNmt més proper al grup de Formentera. Els autors indiquen que aquest fet pot ser degut a un flux asimètric en còpies efectives de gens, sense poder descartar el paper d'introduccions humanes recents.



1.2.1.3. *Podarcis tiliguerta* (Gmelin 1789)

Aquesta espècie és endèmica de les illes de Còrsega i Sardenya, juntament amb les illes i illots que es troben al seu voltant. El nombre de subespècies descrit s'ha fet bàsicament en funció de patrons de coloració i característiques morfològiques (Bruschi *et al.* 2006), i actualment se n'han descrit deu: *P. t. contii*, *P. t. eiselti*, *P. t. granchii*, *P. t. grandisonae*, *P. t. maresi*, *P. t. pardii*, *P. t. ranzii*, *P. t. rudolphisimonii*, *P. t. sammichelii* i *P. t. toro* (Corti i Lo Cascio 1999). La IUCN ha valorat aquesta espècie com a de Preocupació Menor - *Least Concern* (LC) a nivell internacional i com a No Amençada (NA) a l'àmbit nacional.

En general, es caracteritza per tenir el cap curt i lleugerament deprimat, i una longitud (de cap a cos) de 56 mm i 53 mm a mascles i femelles, respectivament; corresponent a una mida mitjana dins el gènere *Podarcis* (Arnold i Ovenden 2002, Bruschi *et al.* 2010).

Tal i com passa a altres espècies d'aquest gènere, també presenta una alta variabilitat intraespecífica, tant en patrons de coloració com en les tonalitats (**Figura 18**), per la qual cosa es poden trobar inclús alguns individus melànics (Bruschi *et al.* 2006). En general, tenen una tonalitat marronosa, encara que dorsalment varia la intensitat d'aquest color i pot presentar taques que varien entre el verd i el negre. Per altra banda, la coloració ventral sol ser obscura. També podem trobar diferències sexuals en la coloració ja que els mascles solen tenir taques de tonalitat obscura a la regió dorsolateral (Arnold i Ovenden 2002; Bruschi *et al.* 2010).

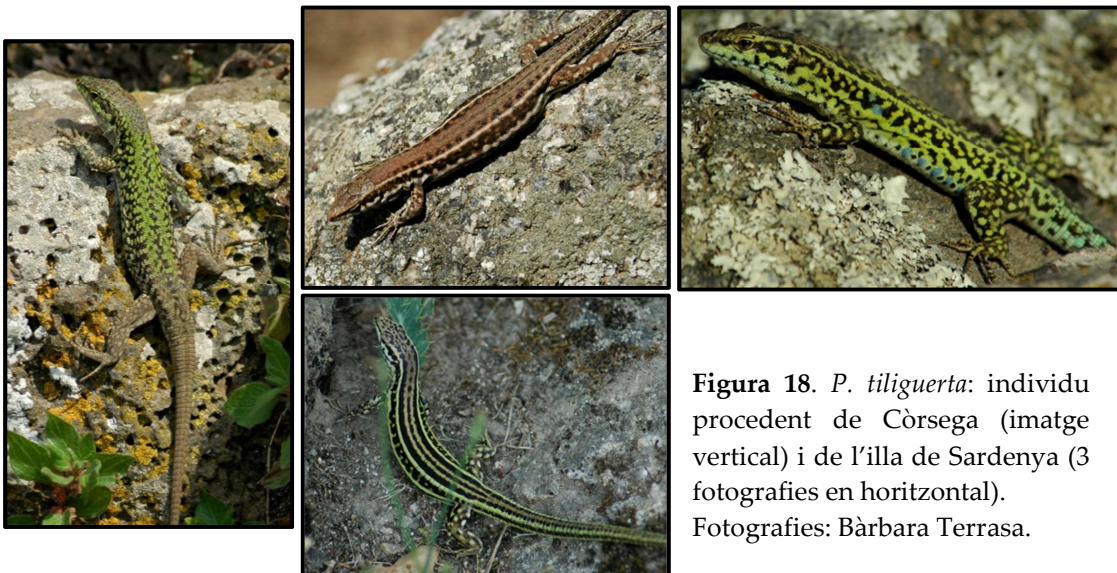


Figura 18. *P. tiliguerta*: individu procedent de Còrsega (imatge vertical) i de l'illa de Sardenya (3 fotografies en horitzontal). Fotografies: Bàrbara Terrasa.

Aquesta espècie, com ja s'ha esmentat, viu a les illes de Còrsega (França) i Sardenya (Itàlia), les quals presenten una separació de sols 10 km (**Figura 19**). Les dues illes, durant la seva història geològica, han estat connectades en diverses ocasions, durant el període Quaternari, per això, tenen molt en comú biogeogràficament i sobretot, relatiu a espècies endèmiques (Mannion i Vogiatzakis 2007).

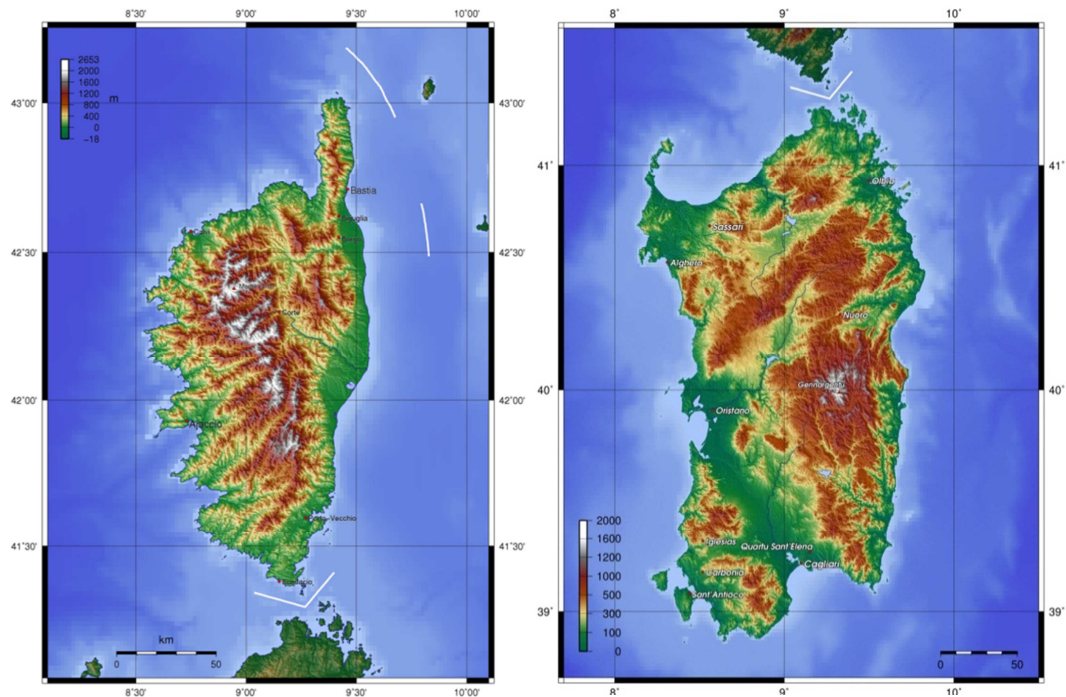


Figura 19. Mapa topogràfic de Còrsega (esquerra) i Sardenya (dreta). Font: www.worldofmaps.net.

Sardenya, amb una àrea d'uns 24.000 km², és la segona illa més gran de la Conca Mediterrània. Es caracteritza per una morfologia muntanyosa amb altiplans i algunes zones planes. Es troba a una distància quasi equidistant d'Europa i Àfrica. Geomorfològicament es pot dividir en 3 regions: la de l'est, caracteritzada per la seva variació de relleu, i amb la presència de les muntanyes de Limbara i Gennargentu; la central, amb fluxos de lava basàltica i; la de ponent, amb roques del Paleozoic. A la dècada dels 80, el Govern va implementar legislació mediambiental per a la conservació i la protecció dels paisatges, la flora i la fauna característica del l'illa (Mannion i Vogiatzakis 2007).

Per una altra banda, tenim l'illa de Còrsega, la quarta més gran de la Mediterrània (el seu territori ocupa una àrea de 8.682 km²). Es troba a uns 90 km d'Itàlia i a 170 km de França. Es caracteritza per ser l'illa de la Mediterrània situada més al nord, amb un major grau d'humitat i la més muntanyosa, amb pics de més de 2.000 m (el pic més alt és Monte Cino amb 2.706 m). Aquesta diversitat de topografia dona lloc a diversos microclimes i comunitats vegetals en funció de l'alçada. L'illa consta de dues unitats: la costa occidental, caracteritzada per penya-segats i una topografia molt muntanyosa i, el nord-est, on predomina una topografia més plana



amb una altura màxima de 1.767 m a San Pedrone. Ambdues es separen per un corredor, que crea unitats morfològiques i geològiques ben diferenciades (Vogiatzakis *et al.* 2008). És una illa poc poblada, amb una població total d'unes 272.000 persones, la meitat de la qual es concentra en dues ciutats costaneres: Ajaccio i Bastia. La majoria de pobles estan habitats per menys de 100 persones, per la qual cosa la densitat de població es troba amb una mitjana de 30 habitants (h.) per km² (essent en més de la meitat de l'illa de sols 10 h./km²) (Mannion i Vogiatzakis 2007).

En relació a l'espècie de sargantana que viu a ambdues illes, alguns estudis han destacat la seva gran variabilitat, i han intentat determinar com s'estructura l'espècie (Capula 1996; Pinho *et al.* 2004; Harris *et al.* 2005). Segons Corti i Lo Cascio (1999) es coneixen un total de 10 subespècies, de les quals tan sols dues estan present a l'illa de Sardenya i les altres 8 només a Còrsega.

Capula (1996), va analitzar la variabilitat genètica de l'espècie a través d'electroforesis d'alloenzims. Els seus resultats indicaren una gran variabilitat intraespecífica, la més alta coneguda dins les espècies de sargantanes. I les anàlisis genètiques dividien geogràficament l'espècie en 3 grups diferenciats: el primer, format per poblacions de Còrsega; el segon, amb poblacions de les illes que es troben al sud-est de Còrsega i finalment, el darrer, inclouria les poblacions de Sardenya, juntament amb l'illa Meli. L'autor relaciona la presència dels diversos grups amb l'existència de deriva genètica i amb esdeveniments geològics durant el Pleistocè.

Posteriorment, es van realitzar estudis filogenètics basant-se en marcadors moleculars d'ADNmt per tal de determinar si està formada per un conjunt d'espècies. Harris *et al.* (2005) van analitzar la seqüència del 12S l'ARNr de *P. tiliguerta* a 18 individus de 13 poblacions, dels quals també es va amplificar el gen del citocrom a 4 de les mostres. Els resultats mostraren la separació de les mostres en dos grups: Còrsega i Sardenya; amb la presència de 5 i 3 clades, respectivament. També observaren una alta variabilitat, la qual cosa, creuen els autors, podria indicar que es tracta d'un complex d'espècies.

L'estudi de Podnar i Mayer (2005) inclou diferents espècies de *Podarcis*, on *P. tiliguerta* està representada per 4 mostres i analitza també l'ARNr 12S. Els resultats indiquen 3 llinatges separats: 1 a Còrsega i 2 a Sardenya. Els autors consideren que és una espècie politípica (és a dir, una única espècie formada per diverses subespècies), per tant, no la consideren un complex d'espècies; i degut a l'alta variabilitat consideren necessari un estudi més ampli amb un major nombre de mostres i comparant marcadors nuclears i mitocondrials.

Per una altra banda, Bruschi *et al.* (2006) varen realitzar estudis morfològics a més de 2.700 individus de l'espècie en base a la seva longitud cap-cos i altres trets de folidosi (són aquells que fan referència a les escates). En conjunt, aquestes característiques físiques es van emprar per analitzar si era un grup d'espècies, i també per valorar la seva qualitat com a marcador evolutiu. A través d'arbres filogenètics basats en UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) i gràfics MDS (escalat multidimensional), els autors consideren que els caràcters de la folidosi

indiquen una bona separació entre les dues illes principals (Còrsega i Sardenya).

Posteriorment, Vasconcelos *et al.* (2006), va ampliar l'estudi de Harris *et al.* (2005), de l'ARNr 12S amb 17 individus nous, obtenint un total de 34 seqüències i 343 pb. Les relacions filogenètiques indicarien que Còrsega i Sardenya serien llinatges independents, a la vegada que identificarien 3 clades: 2 a Sardenya i 1 a Còrsega.

1.2.2. Espècies continentals de *Podarcis*

El gènere *Podarcis* es troba àmpliament distribuït a l'Europa continental, essent *P. muralis* i el conjunt d'espècies que formen el complex de *P. hispanica*, els llinatges més ben representats. Dins el complex *P. hispanica* s'hi troben diferents espècies molt properes i amb característiques similars pel que fa a dieta, cicles d'activitat, termoregulació, entre d'altres, i que són simpàtriques a algunes àrees de la Península Ibèrica (Martín-Vallejo *et al.* 1995). Ambdós (*P. muralis* i el complex *P. hispanica*) conviuen dins la Península Ibèrica amb altres *Podarcis* com *P. bocagei* i *P. carbonelli* (Pinho *et al.* 2006).

1.2.2.1. *Podarcis muralis* (Laurenti 1768)

L'espècie té una àmplia distribució (**Figura 20**) al sud, a l'oest i a la part central d'Europa, on ocupa una gran varietat d'hàbitats (Bellati *et al.* 2011). Arreu de la Península Ibèrica en podem trobar diverses poblacions, les més occidentals es troben al límit entre Astúries i Galícia, mentre que les orientals estan marcades pel massís de Penyalgosa (Castelló). Els Pirineus, Prepirineu, la Serra Cantàbrica i tota la franja cantàbrica delimiten l'extrem nord. A l'interior de la Península Ibèrica podem trobar poblacions al Sistema Ibèric i també al Sistema Central sobretot a zones molt assolellades i obertes, espais adequats per al seu mecanisme de termoregulació (Diego-Rasilla i Salvador 2015).



Figura 20. Distribució de *Podarcis muralis*. Font: IUCN Red List. <http://maps.iucnredlist.org/>.



Són lacèrtids de mida petita, amb una llargària que oscil·la entre els 48 i 69 mm (**Figura 21**). El seu comportament varia en funció de l'hàbitat i la climatologia ja que les poblacions que resideixen en hàbitats de muntanya i zones amb un clima oceànic, presenten un període d'inactivitat hivernal. Per altra banda, les poblacions que habiten a climes més benignes, estan actives durant quasi tot l'any (Diego-Rasilla i Salvador 2015).



Figura 21. Individus de l'espècie *P. muralis* de Segovia. Fotografies: Valentín Pérez Mellado.

L'IUCN ha valorat el seu estat de conservació com a de Preocupació Menor - *Least Concern (LC)* i a l'àmbit nacional es troba dins la categoria de No Amenaçada (NA). Ha estat catalogada en aquesta categoria degut a la seva àmplia distribució, que fa assumir una població elevada, i també per la seva tolerància a un ampli tipus d'hàbitats (Böhme *et al.* 2009).

L'espècie presenta una alta variabilitat en els patrons de coloració, biomètrics i de folidosi (Bellati *et al.* 2011). Podem destacar una coloració dorsal marró o marró-verdosa, amb uns laterals de coloració més obscura i, generalment, uniforme. Per altra banda, la coloració ventral és més clara, amb petites taques negres, observant-se unes tonalitats molt diferents que van del blanquinós al vermellós, passant pels grisos (Diego-Rasilla i Salvador 2015).

La seva alimentació és insectívora (Barbadillo *et al.* 1999) i hi destaquen els petits artròpodes com les aranyes, homòpters, coleòpters i dípters (Diego-Rasilla i Salvador 2015).

Estudis filogenètics recents basats en l'anàlisi del *Cytb* (ADNmt) i 10 STR (*Short Tandem Repeat*) en més de 280 mostres (Gassert *et al.* 2013) indiquen la presència de dos llinatges separats fa 1,23 Ma. D'una banda es troba el clade format per l'oest de França on estan incloses les poblacions des dels Pirineus fins a Bretanya i d'altra banda el clade de l'est francès format per les poblacions del sud de França fins a Alemanya, Bèlgica i Luxemburg. Segons els resultats aquest darrer clade s'hauria subdividit en dos subgrups fa uns 0,38 Ma. El mateix any, un altre estudi filogenètic que emprà 2 gens mitocondrials i 3 gens nuclears amb individus de 52 localitats, observà diversos llinatges que s'haurien separat durant el Plistocè (Salvi *et al.* 2013).

1.2.2.2. Complex *Podarcis hispanica* (Steindachner 1870)

La sargantana ibèrica, coneguda en un principi com a *Podarcis hispanica*, ha estat estudiada durant dècades degut a la seva diversitat, cosa que ha provocat repetides revisions de la taxonomia tant a nivell específic com intraespecífic (Pérez-Mellado 1998b). Després de diversos estudis s'ha demostrat que en realitat és un complex d'espècies que engloben el que es considerarien diversos llinatges, alguns encara pendents de descriure (Harris i Sá-Sousa 2001, 2002; Busack *et al.* 2005; Pinho *et al.* 2006; Geniez *et al.* 2007, 2014; Renoult *et al.* 2009, 2010; Kaliontzopoulou *et al.* 2012). El complex *P. hispanica* englobaria diverses formes, les quals presenten unes característiques particulars de patrons de coloració, morfometria i amb regions de distribució ben diferenciades. Després d'anàlisis exhaustives en base a característiques morfològiques i genètiques, s'ha actualitzat la taxonomia dins del complex *P. hispanica*, i alguns dels grups han passat a considerar-se espècies pròpiament dites, per la qual cosa se n'han descrit les morfologies particulars i se n'han concretat els hàbitats (Renoult *et al.* 2010).

Segons Geniez *et al.* (2014) a la Península Ibèrica hi trobem les següents espècies: *P. bocagei*, *P. carbonelli*, *P. vaucheri*, *P. liolepis*, *P. hispanica*, *P. guadarramae* i *P. virescens* (Geniez *et al.* 2014). Com es pot observar a la figura **Figura 22** aquestes diferents espècies es distribueixen de la següent forma: *P. bocagei* es troba al nord-oest de la Península Ibèrica (nord de Portugal i nord-oest d'Espanya). L'oest, juntament amb una població al Parc Nacional de Doñana (Harris *et al.* 2002), està ocupat per *P. carbonelli*. *P. hispanica* es troba al llevant d'Espanya (més concretament, a les províncies d'Alacant, Múrcia, Almeria i Granada); i presenta 2 subespècies, la *sensu stricto* i la *P. h. galera* (Geniez *et al.* 2007). *P. vaucheri*, considerada espècie després dels estudis d'Oliverio *et al.* (2000) i Busack *et al.* (2005), habita el nord d'Àfrica i Andalusia occidental (més concretament a les muntanyes bètiques, juntament amb les àrees adjacents al sud del riu Guadalquivir). *P. liolepis* correspon a les poblacions del nord-est de la Península Ibèrica (els límits dins aquesta regió encara no es coneixen bé), fins arribar també al sud de França; juntament amb les poblacions de les illes Columbretes (abans considerades *P. atrata*) i una població aparentment introduïda a Alemanya. *P. virescens*, endemisme ibèric, habita Portugal (centre i sud) i la regió sud-central d'Espanya situada al sud del Sistema Central (Extremadura, Castella la Manxa i Madrid). A zones del litoral de Portugal aquesta espècie és simpàtrica amb *P. carbonelli*. Per la seva banda, *P. guadarramae* viu al centre-oest i nord-oest de la Península Ibèrica, i a algunes illes de la costa gallega (Geniez *et al.* 2014).

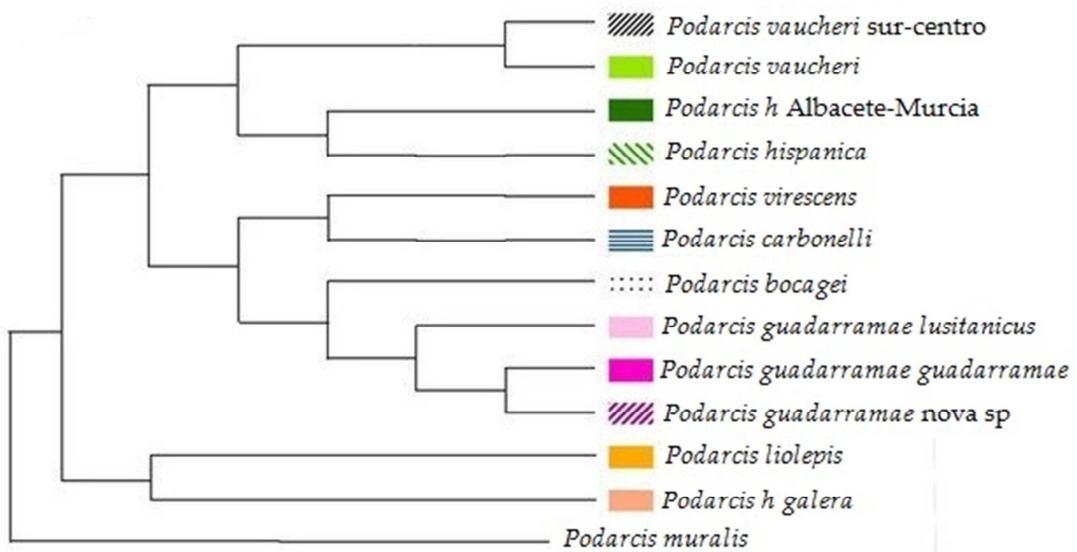
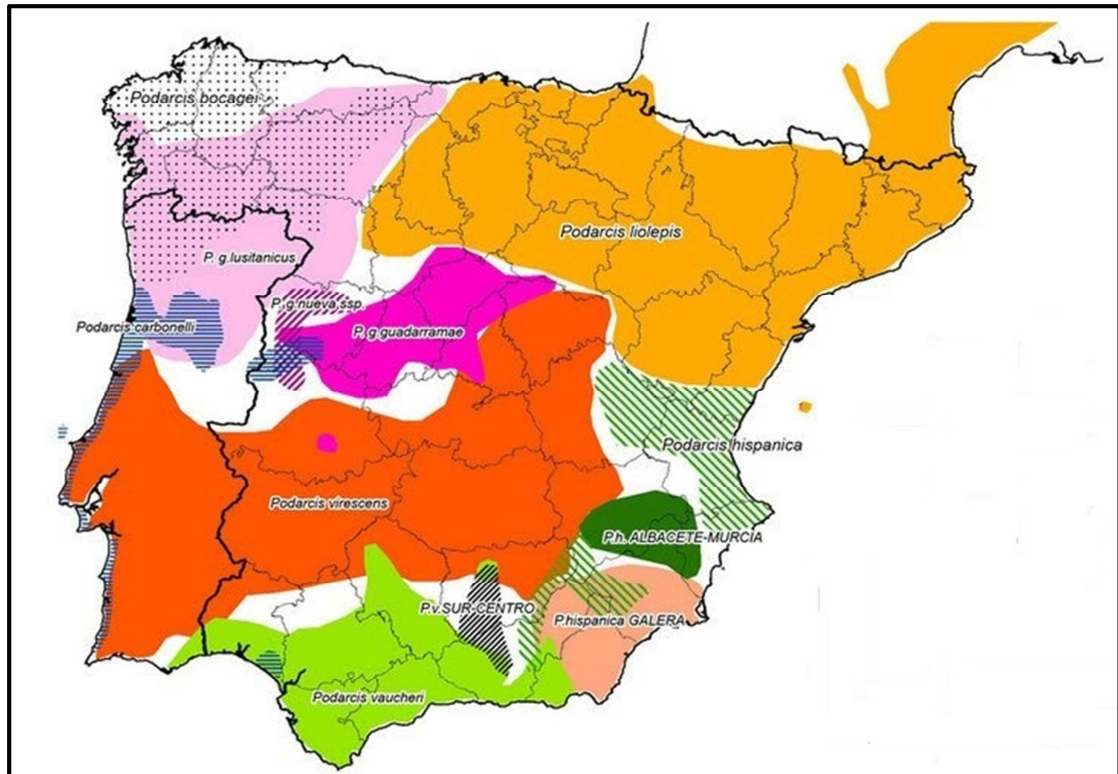


Figura 22. Distribució de les diferents espècies que conformaven el complex *P. hispanica*. Font: modificat de V. Sancho (<http://esoecomotodo.jimdo.com/reptiles/podarcis-hispanica/>).

A continuació s'exposa una breu descripció de les recent descrites espècies centrant-nos només en aquelles que han estat emprades en aquest treball:

***Podarcis hispanica* (Steindachner 1870)**

És una espècie de mida petita (segons Diego-Rasilla i Pérez-Mellado (2003) de cap a final del cos fa entre 37-70 mm) i amb el cos i el cap aplanats (**Figura 23**). Presenta dos tipus principals de coloració que són majoritaris, els que tenen un patró molt marcat i els que quasi no en presenten, també apareixen alguns individus amb un patró entremig. Tenen una coloració dorsal marró clar, amb línies negres dorsolaterals que en alguns individus es poden presentar fragmentades en petites taques negres. L'espècie té dimorfisme sexual, ja que el patró a les femelles divergeix. Per la part ventral destaca el color blanquinós, encara que alguns individus poden mostrar una tonalitat grogosa al coll (Geniez *et al.* 2007).

A nivell internacional l'IUCN la classifica com a *Least Concern* (LC) i *No Amenaçada* (NA) a l'àmbit nacional (Mateo-Miras *et al.* 2009).

Els resultats d'estudis filogenètics realitzats (Pinho *et al.* 2006; Geniez *et al.* 2007; Renoult *et al.* 2009, 2010; Kaliontzopoulou *et al.* 2012) no són concloents a l'hora de definir 'l'estatus' i anomenar els grups que conformen *P. hispanica*: *P. hispanica sensu stricto* i *P. hispanica galera*. Com ja hem dit, la sistemàtica del grup ha estat, i està, en constant revisió i encara que estudis recents hagin determinat noves espècies, no està esclarida la taxonomia dins *P. hispanica*, ja que es requereixen estudis més exhaustius.

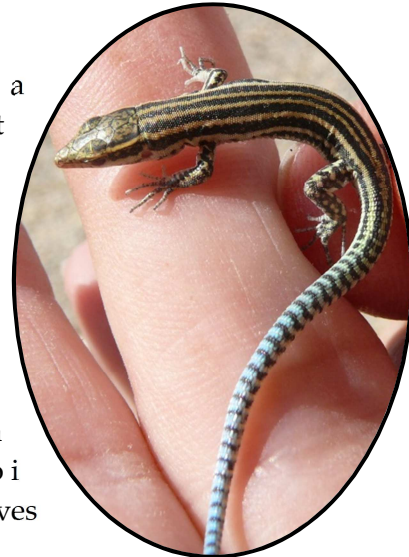


Figura 23. Subadult de *P. hispanica sensu-stricto* procedent de Múrcia. Fotografia: Valentín Pérez Mellado.

***Podarcis vaucheri* (Boulenger 1905)**

La seva longitud de cap a cos arriba fins els 60 mm i el cap està lleugerament deprimat i presenta taques negres. Té una coloració dorsal gris violeta o verd amb petites taques negres. El ventre és blanc o ataronjat pàl·lid amb algunes taques externes negres; endemés al coll també s'hi troben petites taques negres.

El seu estatus de conservació, amb dades del IUCN del 2008, és de *Least Concern* (LC) o de Preocupació Menor.

L'alimentació que es coneix correspon a la regió del Marroc i es caracteritza per la presència d'homòpters, coleòpters, dípters, aranyes, himenòpters, àcars, quilòpodes, ortòpters, heteròpters, lepidòpters i formícids (Salvador i Busack 2015).

***Podarcis liolepis* (*L. muralis liolepis*, Boulenger 1905; *Podarcis liolepis*, Renoult *et al.* 2010)**

Morfològicament es caracteritza per tenir una mida petita (la majoria de poblacions tenen individus d'entre uns 44-53 mm de cap a final del cos, tant mascles com



femelles), encara que hi ha variabilitat geogràfica (**Figura 24**) ja que es troben poblacions d'una major longitud (per exemple als Pirineus i a les Illes Columbretes, les quals presenten més d'uns 62 mm). Mostren escassa coloració, amb el dors gris pàl·lid o marró (amb alguns individus en petites taques negres).



Figura 24. Individus de *P. liolepis* de diferents procedències (d'esquerre a dreta): Sòria, Xàtiva i Columbretes. Fotografies: Valentín Pérez Mellado.

Respecte a la seva distribució s'han trobat individus des del nivell de la mar fins a 1.700 m (amb algunes observacions puntuals als Pirineus a més de 2.600 m).

L'espècie no ha estat catalogada, però la seva extensa distribució fa pensar que s'inclouria dins *Least Concern* (LC) o de Preocupació Menor, exceptuant les poblacions de Columbretes, el Mont d'Urgell i l'illa de Santa Clara que es considerarien Rares (degut a la localització geogràfica).

La seva alimentació es compon bàsicament d'insectes, aranyes i isòpodes, tot i que la població de les Illes Columbretes es caracteritza per alimentar-se d'escorpins, material vegetal i isòpodes marins.

Conté dues subespècies: *P. liolepis atrata* i *P. liolepis liolepis*. La primera habita les Illes Columbretes i és de mida gran (els mascles fan aproximadament entre 65,3-68 mm, i les femelles entre 61,7-61,9 mm), mentre que la segona es troba al sud de França i al nord-est peninsular, mostrant una major diversitat de mides en funció de la regió que habita, encara que en general és de mida petita (per exemple, en poblacions franceses tenen una longitud d'uns 55 i uns 50 mm en mascles i femelles respectivament) (Salvador i Carretero 2016).

En aquest treball aprofundirem més en la segona subespècie, *P. l. atrata*, que es troba a les Illes Columbretes, arxipèlag situat a la Mediterrània enfront de la costa del llevant de la Península Ibèrica, a uns 50 km de Castelló i a uns 100 km de l'illa d'Eivissa. Aquest territori té un origen volcànic, i es formà recentment després dels episodis volcànics del Plistocè, fa entre 1 Ma i 300.000 anys (Aparicio *et al.* 1991; Juan *et al.* 2004) i consta d'una superfície total aproximada de 19 ha (Castilla *et al.* 1998a, 2005). Està format per quatre grups d'illes (**Figura 25**): i) Illa Grossa (o *Columbrete grande*) de 13 ha, Mascarat, Senyoreta i Mancolibre; ii) Ferrera o Malaspina d'1'5 ha, Espinosa, Bauzá, Valdés i Navarrete; iii) Foradada d'1'6 ha, Lobo de 0'5 ha i Méndez Nuñez i iv) Carallot o Bergantín, Cerquero, Churraca i Baleato.

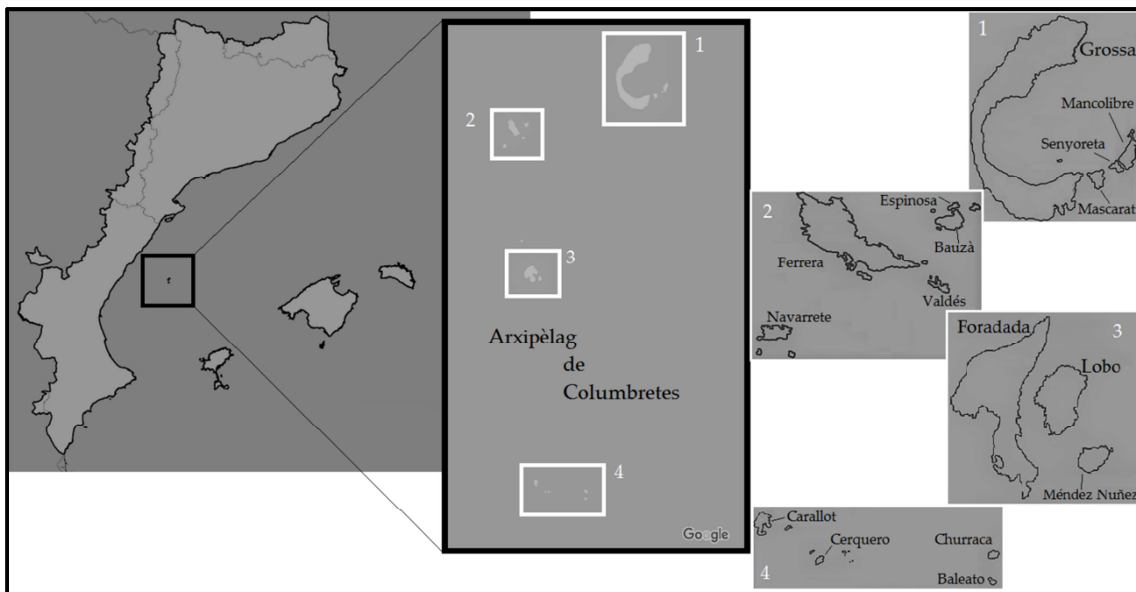


Figura 25. Arxipèlag de Columbretes: localització i illes i illots que el formen.

Els únics vertebrats terrestres presents són les sargantanes (*Podarcis liolepis*) que conviuen amb diferents aus, com falcons (*Falco eleonorae*), gavines (*Larus cachinnans michahellis*, *Larus audouinii*) i ocells migratoris, entre d'altres (Castilla i Bauwens 1991). L'estat de conservació encara no ha estat concretat degut al seu recent renomament però es considera que hauria de ser de Rara ja que el reduït nombre d'individus, al seu habitat fragmentat i el fet de ser una espècie endèmica, són factors que afavoririen la seva extinció (Castilla *et al.* 2006).

L'arribada d'aquesta espècie a les Illes Columbretes es creu que va succeir fa uns 20.000 anys, durant la darrera glaciació (Würm), quan el nivell del mar es va veure reduït en uns 120 m, la qual cosa possibilita el pas d'aquests i altres animals terrestres entre la Península Ibèrica i les Illes Columbretes ja que el canal que les separa té una profunditat aproximada d'uns 90-100 m (Castilla *et al.* 1998b).

La situació taxonòmica de les sargantanes en aquesta regió ha estat canviant. Recentment, estudis filogenètics l'han reanomenada *P. liolepis* (Renoult *et al.* 2010; Geniez *et al.* 2014), més concretament com a *P. l. atrata* (Salvador i Carretero 2016),



encara que fins ara era reconeguda com una espècie independent, *P. atrata*, i cal destacar que prèviament es considerava una subespècie del complex de *P. hispanica* (*P. h. atrata*) (Castilla *et al.* 2008). Avui en dia no està clara la separació entre alguns dels recents grups taxonòmics escindits del complex d'espècies format per *Podarcis hispanica* i per tant, en seria necessària una investigació més exhaustiva (Salvador i Carretero 2014).

***Podarcis virescens* (Geniez *et al.* 2014)**

Descrita com a espècie, recentment per Geniez *et al.* (2014). Es caracteritza per ser robusta, amb una longitud (de cap a cos) de 62,3 mm de mitjana en mascles i de 59,7 en femelles.

Morfològicament, solen presentar una tonalitat verdosa al dors (**Figura 26**) i, a la part ventral, blanquinosa, groguenca o ataronjada (la coa i part posterior són grogues). S'ha de destacar que a la part ventral del coll poden presentar punt negres (sobretot els mascles). Els mascles presenten línies dorsolaterals clares (les quals poden ser contínues o fragmentades); per una altra banda, aquestes línies a les femelles són generalment contínues i amb una tonalitat que varia des del blanc al mateix color que el dors. Ambdós sexes també presenten bandes supradorsals, que varien lleugerament de morfologia segons el sexe. Els laterals dels individus mascles són obscurs amb una sèrie d'ocells pàl·lids (Geniez *et al.* 2014).



Figura 26. Sargantana de *P. virescens* de Badajoz.
Fotografia: Valentín Pérez Mellado.

L'espècie encara no ha estat catalogada (per la seva recent descripció), però la seva extensa distribució fa pensar que s'inclourà a la categoria de *Least Concern* (LC) o de Preocupació Menor.

La seva dieta està composta sobretot per aranyes, larves de diversos tipus d'insectes, formícids, isòpodes, hemípters, miriàpodes, dermàpters i vertebrats (Carretero i Salvador 2016).

Podarcis guadarramae (Boscà 1916)

P. guadarramae es caracteritza per habitar ambients més rocosos i presenta el cap més aplanat (**Figura 27**). És un endemisme de la Península Ibèrica i de moment no es troba dins cap de les categories de conservació. Així i tot, se suggereix considerar-la de Preocupació Menor o *Least concern* (LC), i a algunes de les poblacions presents a illes es proposa considerar-les com a Vulnerable (Cíes, Ons, Onza, Sálvora i Noro) o En Perill (Sagres, Vionta i Herbosa). És una espècie activa la major part de l'any, però amb una activitat més reduïda a les regions muntanyenques durant l'hivern (entre novembre i gener). La seva alimentació es basa en aràcnids, coleòpters, dípters i homòpters.



Figura 27. Individus de *P. guadarramae* de Salamanca. Fotografies: Valentín Pérez Mellado.

L'espècie consta de dues subespècies: *P. g. guadarramae* (Boscà 1916) i *P. g. lusitanicus* (Geniez *et al.* 2014), que presenten una alta divergència genètica en estudis basats en ADN nuclear (Pinho *et al.* 2007, 2008), ambdues podrien en un futur considerar-se espècies diferents segons estudis centrats en les zones de contacte entre ambdues subespècies (Geniez *et al.* 2014).

P. g. guadarramae es caracteritza per una mida corporal mitjana (de 53,8 mm de cap a cos en mascles i 51,6 mm en femelles), amb el cap i cos aplanat. Presenten en tot el cos un gran nombre de taques negres. També mostren un nombre mitjà de 59,9 escames dorsals en mascles i 57,9 en femelles. El nombre de porus femorals també varia segons el sexe, amb 18,5 en mascles i 17,17 en femelles. La seva coloració és reticulada, encara que algunes femelles també són retxades (Ortega *et al.* 2014, 2015).

Per altra banda, les *P. g. lusitanicus*, es diferencien de l'anterior per tenir una mida lleugerament inferior (amb una longitud de cap a cos de 51,5 mm a mascles i 48,7 a femelles), presenten el cap encara més aplanat i un nombre inferior d'escames i porus femorals. El disseny del dors dels mascles és molt variable, en funció de l'hàbitat, i existeixen individus totalment reticulats i individus majoritàriament retxats. També hi ha diversitat en la coloració, ja que s'han descrit individus amb el dors verd i d'altres marrons-grisencs; mentre que el ventre sol ser blanc amb tonalitats roses o ataronjades en algunes poblacions, juntament amb màcules blaves amb major o menor intensitat i nombre (Carretero *et al.* 2015).



1.2. LA PIGMENTACIÓ

A la natura podem trobar una gran diversitat de coloracions, a les quals se'ls han atribuït diverses funcions: ocultació, termoregulació, advertència de perill de toxicitat, mimetisme, selecció sexual i protecció immunològica. L'ocultació és una funció molt comuna de les coloracions; se sap que molts animals es mimetitzen amb el seu habitat natural quasi a la perfecció. A diverses espècies s'ha observat com variades poblacions d'una mateixa espècie que viuen a diferents hàbitats tenen diferents patrons de coloració en funció de l'entorn (Protas i Patel 2008). Estudis fets al 1930 a



Figura 28. Color dels pelatges a *Chaetodipus intermedius* i els substrats on viu (roques clares i lava). Font: Majerus i Mundy (2003).

Chaetodipus intermedius ja mostraven una forta correlació entre el color del pelatge dorsal i el color del substrat on viu (**Figura 28**). En la majoria de llocs estudiats, aquests ratolins tenen el pelatge dorsal ros i el ventral blanc, i habiten en roques blanquinoses. Mentre que alguns que viuen en corrents de lava, són típicament melànics, amb coloracions dorsals obscures i ventrals blanques (Nachman *et al.* 2003). En rates, la gran semblança entre el color del pelatge dorsal i el substrat, és adaptatiu, cosa que aporta una protecció críptica enfront dels depredadores (Majerus i Mundy 2003).



Figura 29. Diversitat de coloració dins el gènere *Podarcis*. Fotografies: Bàrbara Terrasa.

En els vertebrats hi ha una alta variabilitat quant a pigmentació i patrons de coloració: des del blanc i negre de les zebres, passant pels marrons d'algunes aus, i arribant als colors brillants dels peixos tropicals. És curiós veure com espècies molt properes poden presentar patrons molts diferents, mentre que espècies més distants tenen una aparença increïblement semblant (Mills i Patterson 2009). Una de les característiques més sorprenents de les sargantanes és la seva gran variabilitat de

coloració (**Figura 29**); algunes poblacions són per complet melàniques (de color negre uniforme), i altres exhibeixen tons dorsals verd brillant o el color blau ultramar, com a dominant (Pérez-Mellado 2009).

En els mamífers i les aus, la pigmentació de pell, cabells, plomes i ulls depenen principalment de les funcions dels melanòcits, un grup reduït de cèl·lules especialitzades en la síntesi i distribució de la melanina (**Figura 30**). Els melanòcits deriven de cèl·lules embrionàries (no pigmentades) anomenades melanoblasts, les quals procedeixen de la cresta neural. Els melanoblasts, d'origen neuroectodèrmic, migren de la cresta neural a l'epidermis (Mills i Patterson 2009) i, a més de en mamífers i aus, també els trobem en peixos, amfibis i rèptils (Lozano i Solano 1989). Els melanoblasts es transformen per maduració, en melanòcits; que són els responsables de sintetitzar i emmagatzemar la melanina dins els melanosomes (orgànuls intracel·lulars especialitzats de les cèl·lules pigmentàries que posteriorment passaran als queratinòcits, on es depositaran a pèls i plomes en desenvolupament) (**Figura 31**) (Mills i Patterson 2009), i són els responsables de la majoria de coloracions visibles en mamífers i altres vertebrats (Schiaffino 2010). La precisió en la migració, distribució i funcionament dels melanoblasts i melanòcits determina el fenotip dels organismes (Yamaguchi *et al.* 2007).

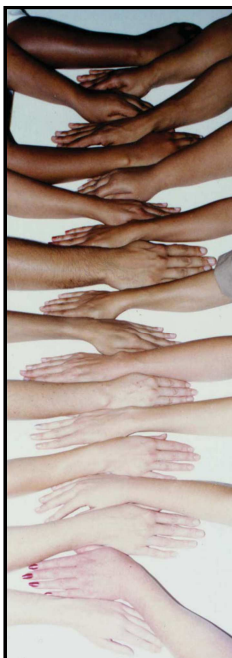


Figura 30. Variació de pigmentació a la pell dels humans. Font: Sturm (2009).

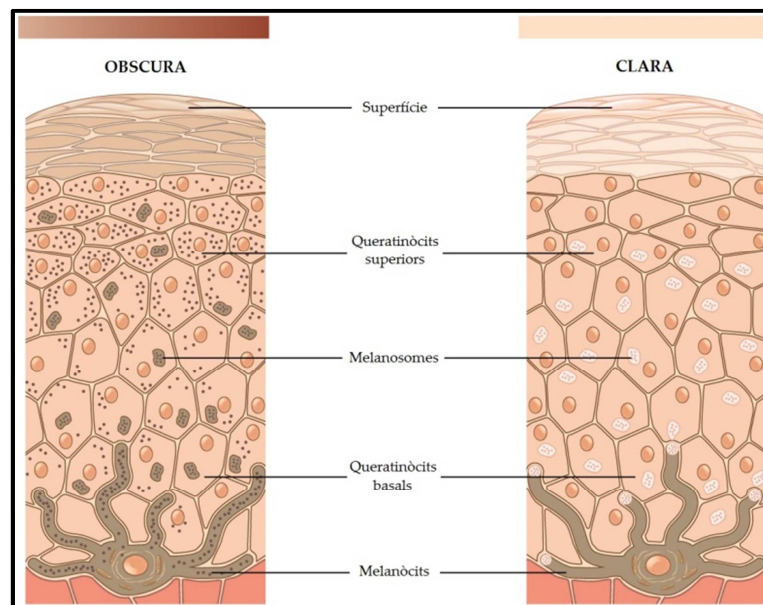


Figura 31. Representació de com la quantitat de melanina produïda pels melanòcits i transportada fins als queratinòcits, afecta la coloració de la pell. Font: modificat de <http://www.alyvea.com/anatomy/layers-skin.php>.

El sistema pigmentari és molt interessant per analitzar les connexions entre genotip i fenotip, ja que és un tret amb base genètica, però també amb una important influència ecològica. Per tant, fenotips presents a poblacions naturals són una molt



bona oportunitat per estudiar la base genètica de la diversitat observada i descobrir els canvis evolutius que s'han produït (Hoekstra 2006).

Conèixer el pigment responsable de la coloració és fonamental per comprendre la variació de color (Roulin i Ducrest 2013). La majoria dels nostres coneixements sobre la ruta metabòlica de la pigmentació s'han obtingut de mamífers, encara que la via de la melanina ha estat molt conservada a tots els vertebrats (Hofreiter i Schoneberg 2010). En mamífers, els melanòcits, sintetitzen dos tipus de pigments: les eumelanines responsables de les tonalitats negra i marró; i les feomelanines encarregades de les coloracions que van del groc al vermell. Els mamífers presenten dos factors que determinen la coloració: i) **els pigments disponibles**, tenint en compte que el tipus de melanina produïda depèn de la funció dels enzims implicats en la seva síntesi i en la disponibilitat dels substrats (Yamaguchi *et al.* 2007) i, ii) **la seva distribució**, tant a nivell cel·lular com dins l'organisme (Hofreiter i Schoneberg 2010). Dins la ruta biosintètica de les melanines, intervenen de forma principal, dos enzims: la tirosinasa i la dopacrom tautomerasa. El primer s'encarrega de catalitzar la reacció a través de la qual l'aminoàcid tirosina s'oxida a dopa, i de la transformació d'aquest en dopaquinona. I, també és l'enzim més important d'entre tots els que estan implicats a la melanogènesi (MREs), ja que regula la velocitat i l'especificitat del procés (Hoekstra 2006). Al segon enzim, la dopacrom tautomerasa, li correspon la tautomerització del dopacrom en el 5,6-dihidroindol (Lozano i Solano 1989).

Els mamífers i les aus només tenen un tipus de cèl·lula pigmentària (el melanòcit), mentre que en els vertebrats poiquiloterms les cèl·lules pigmentàries es coneixen com cromatòfors i en poden tenir diversos: melanòfors, xantòfors, eritròfors, iridòfors, leucòfors i cianòfors (**Figura 32**). Els cromatòfors, al contrari que els melanòcits, no transporten els pigments a altres cèl·lules, sinó que els retenen al seu interior (Mills i Patterson 2009). Cal remarcar que les cèl·lules pigmentàries que produeixen melanina, es coneixen, com s'ha indicat anteriorment, com a melanòcits en mamífers i aus; i com a melanòfors en peixos, amfibis i rèptils (Cooper i Raible 2009).

La coloració en amfibis i rèptils es produeix degut a: i) la reflexió i dispersió de la llum per part de cèl·lules i teixits (coloració estructural) i, ii) per l'absorbància de la llum a través dels pigments, principalment per melanòfors, iridòfors i xantòfors (Olsson *et al.* 2013). Canvis ràpids de coloració s'han relacionat amb canvis estructurals (d'agregació i/o dispersió) d'aquests principals cromatòfors a les diferents capes cel·lulars de la dermis (Cooper i Raible 2009; Mills i Patterson 2009) (**Figura 33**). En estudis realitzats a *Anolis carolinensis* (Taylor i Hadley 1970) per analitzar aquests canvis ràpids de coloració, es va observar com l'estructura anatòmica de la dermis era la següent (**Figura 32 i 33**): la capa més externa (la més propera a l'epidermis) està formada per xantòfors, cèl·lules que contenen els pigments groc-vermell. Per davall, corresponent a la capa intermèdia, es troben els iridòfors, que contenen cristalls de guanina que no tenen color però tenen propietats de dispersió i reflexió de la llum (la coloració depèn de la mida i la distribució de les làmines). Finalment, la capa de pigments més profunda està formada pels melanòfors, que són els responsables d'emmagatzemar la melanina i absorbir les longituds d'ona que queden. Canvis en la producció i dispersió dels grànuls de melanina són, en darrer lloc, els responsables dels

canvis de color a la part dorsal dels rèptils (Rosenblum *et al.* 2004). A més, aquestes capes poden produir quasi qualsevol combinació de colors, essent els xantòfors els responsables del groc, vermell i taronja; els melanòfors del marró, negre i gris; i els iridòfors pels colors amb longituds d'ona curtes (blau, violeta i verd) i també pels platejats (Hofreiter i Schoneberg 2010).

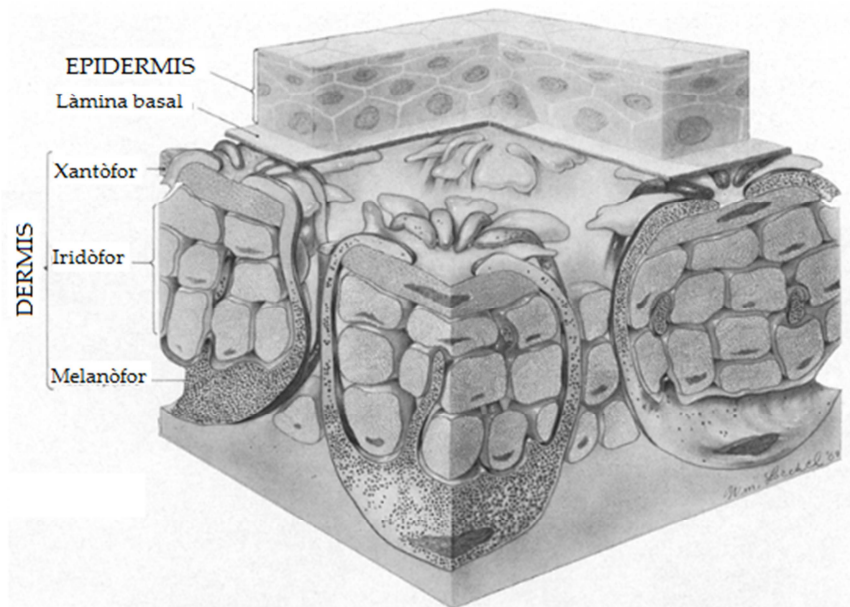


Figura 32. Distribució dels cromatòfors a la dermis d'un *Anolis*. Es mostren 3 estats fisiològics diferents: i) el melanòfor de l'esquerra té els melanosomes agregats a la regió perinuclear, i correspon a un color verd brillant; ii) el central, es relaciona amb una tonalitat que aniria del verd oliva al marró clar, i els melanosomes es troben parcialment dispersats; i, iii) en el de la dreta, els melanosomes es troben completament dispersats, i es relaciona amb una coloració marronenca-negrosa. Font: modificat de Taylor i Hadley (1970).

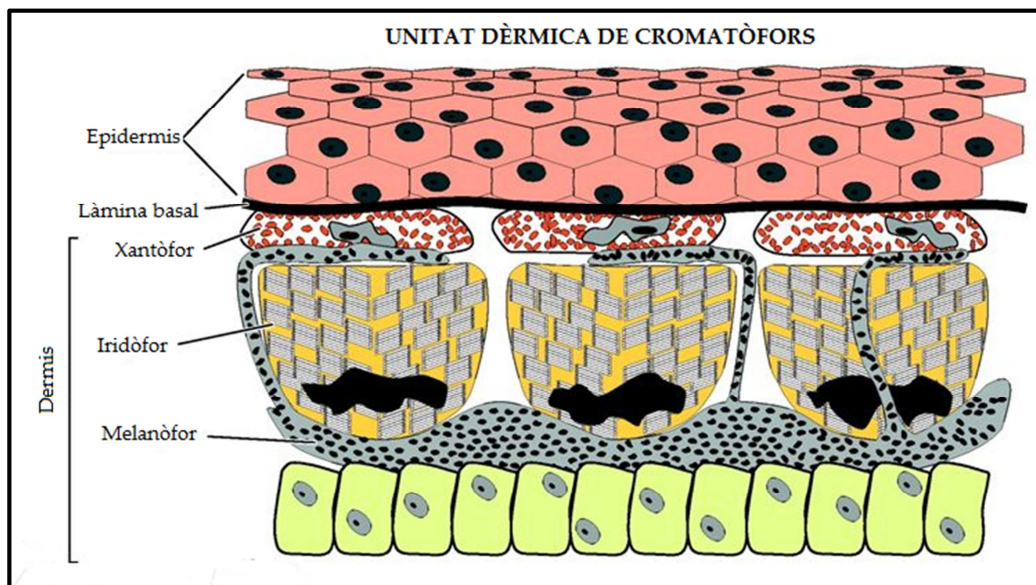


Figura 33. Estructura dels cromatòfors a la pell d'amfibis. Font: Vitt i Caldwell (2013) amb petites modificacions.



Les coloracions de tonalitat groga-vermellosa dels xantòfors es produeixen per la interacció entre dos pigments: els carotenoides i les pteridines. Les pteridines es produeixen de forma endògena a partir de purines; en canvi, els carotenoides s'han d'obtenir de la dieta ja que no els poden sintetitzar. Els iridòfors també tenen un paper important en aquestes tonalitats grogues-carabasses, ja que són el resultat de la seva interacció amb els xantòfors (Olsson *et al.* 2013).

Segons Bagnara *et al.* (2007), en els vertebrats, la coloració blava es manifesta en un conjunt d'espècies diferents que van des dels peixos primitius fins als mamífers. La coloració blava en amfibis i rèptils és molt menys comuna que a peixos; però en tots tres el color blau deriva d'uns cromatòfors específics, els iridòfors; els quals quan es cobreixen per sobre amb cèl·lules pigmentàries grogues, els xantòfors, donen lloc a la coloració verda. La pell abdominal blava en algunes sargantanes és un tret de dimorfisme sexual, el qual és més pronunciat en els mascles (**Figura 34**).



Figura 34. Imatge on es pot veure la diferent coloració ventral d'un mascle (dalt) i d'una femella (posició inferior) procedents de l'illa de Cabrera. Fotografia: Iris Alemany.

Es creia que, al contrari de mamífers i aus, els melanòfors dels rèptils només produïen eumelanina (més que alternar entre els dos tipus de melanina), però un estudi recent (Roulin *et al.* 2013) realitzat a tortugues (*Eurotestudo boettgeri*) ha demostrat la síntesi de feomelanina. Cal remarcar que la seva presència té efectes importants a l'hora d'entendre i estudiar la base fisiològica i genètica de la diversitat de coloració en rèptils. A més, malgrat les diferències entre mamífers i poiquiloterms, ambdós grups comparteixen algunes rutes genètiques importants en el control del procés i també d'altres que intervenen en la diferenciació i formació de les cèl·lules pigmentàries i els seus pigments (Mills i Patterson 2009).

Encara que el color dels rèptils, més concretament dels escatosos, ha estat estudiat al llarg del temps com a exemple d'evolució adaptativa i des de diverses perspectives (ecològica, fisiològica i sistemàtica), poc es coneix sobre la base molecular de la variació del color en aquest grup. Avanços en la comprensió de la base genètica de la pigmentació en altres taxons de vertebrats proporcionaran l'oportunitat d'investigar la base genètica de la variació de color en rèptils (Rosenblum *et al.* 2004).

1.3.1. El melanisme

La pigmentació ha servit de model per a la genètica i la biologia del desenvolupament, com s'ha comentat, però també ha jugat un paper primordial dins la biologia evolutiva (Hoekstra 2006). La relació entre el color de l'individu i l'hàbitat és normalment atribuïda a la selecció natural, però rarament hi ha evidències, sobretot a nivell molecular, que en donin suport (Anderson *et al.* 2009). Per exemple, un dels casos més coneguts d'adaptació són les diferents coloracions de la papallona clapada, *Biston betularia*, de la qual recentment s'ha trobat que la presència de la forma melànica és a causa de la inserció d'un transposó en el primer intró del gen *cortex* (Van't Hof *et al.* 2016).

Una de les principals coloracions en vertebrats és el melanisme. En els mamífers, aquesta coloració negra es deu a l'increment de producció d'eumelanina, juntament a una reducció de feomelanina. Mentre que en poiquiloterms, intervé la duració del senyal de les hormones: α MSH (hormona estimuladora dels melanòcits) i MCH (hormona concentradora de melanina). Una expressió prolongada afecta al nombre de melanòfors, la qual cosa provoca el que es coneixen com a canvis de color morfològics. Per altra banda, una expressió curta produeix canvis de color fisiològics: en el cas de l' α MSH produeix la dispersió dels melanosomes (cosa que provoca una coloració més clara) i; en el de la MCH, causa la seva segregació, amb la qual cosa s'obté una coloració obscura (Mills i Patterson 2009). És de destacar que en poiquiloterms aquests canvis no són permanents, sinó que són reversibles, per tant, no impliquen canvis genètics, encara que s'han relacionat amb la pigmentació alguns gens addicionals que modifiquen la densitat i la distribució dels melanosomes als melanòcits (Hoekstra 2006).

És fa difícil pensar que un tret tan destacat com la coloració d'un animal, no tingui una selecció forta; per tant, les tonalitats negres segur que haurien estat eliminades si no haguessin tingut cap efecte positiu (Cloudsley-Thompson 1999). Hi ha diverses funcions que es relacionen amb el melanisme en ectoterms, entre les més destacades: el de termoregulació, protecció davant la llum ultraviolada (UV), resistència a malalties i selecció sexual (Trullas *et al.* 2007).

Individus melànics de rèptils del gènere *Cordylus* (*C. niger* i *C. oelofseni*) mostren avantatges termoreguladors enfront de temperatures baixes (Clusella-Trullas 2006). A més, recentment Lindgren *et al.* (2014) demostraren, a partir de teixits fossilitzats, com tres rèptils marins extingits (un mosasaure, un ictiosaure i una tortuga llaüt o cuir) eren melànics; i proposaren la convergència evolutiva com a la seva causa, relacionant el melanisme amb avantatges de termoregulació i/o el mimetisme enfront dels depredadors. Altres estudis també l'han relacionat amb avantatges immunitaris, per exemple s'ha trobat una forta relació entre el melanisme i la resistència a infeccions per fongs a l'espècie *Galleria mellonella* (Dubovskiy *et al.* 2013).

Per una altra banda, estudis histològics, en base a la morfologia i estructura de les capes pigmentàries, en la serp *Elaphe quadrivirgata* i en el llangardaix *Pleistodon*



latiscutatus, han mostrat com els individus melànics només presenten melanòfors, contràriament a individus de coloració normal que presenten els 3 pigments (melanòfors, xantòfors i iridòfors) (Kuriyama *et al.* 2013, 2016).



Figura 35. Sargantanes melàniques d'Aire (esquerre) i Moltona (dreta). Fotografies: Bàrbara Terrasa.

En el cas concret de les sargantanes, el melanisme (**Figura 35**), ha tingut una explicació complicada. S'han proposat moltes hipòtesis, des de suposats avantatges termoreguladors fins a una adaptació mimètica que permetria que les sargantanes passassin desapercebudes a les zones d'ombra, fortament contrastades amb les àrees rocoses assolellades. La veritat és que les proves experimentals acumulades en estudis d'individus melànics i no melànics de la mateixa espècie no indiquen més capacitat d'escalfament, refredament o un altre avantatge termoregulador de les sargantanes melàniques. Tampoc no sembla plausible que el mimetisme pugui ser una explicació satisfactòria per a l'aparició d'aquest tret, perquè només seria útil en zones ombrejades. La veritat és que la incògnita es manté, ja que l'extensió del melanisme és molt notable en nombroses poblacions, no tan sols de les dues espècies de les Balears, sinó de moltes altres de la Mediterrània i d'altres àrees geogràfiques, la qual cosa advoca a favor d'una explicació adaptativa per aquest caràcter (Pérez-Mellado 2009).

1.3.2. Genètica i ambient

Ja hem dit que a la naturalesa hi trobem una important multitud de colors, per tant, no és sorprenent que en vertebrats, fins ara, es coneguin 368 loci relacionats amb la pigmentació, dels quals han estat clonats 159 gens (Hofreiter i Schoneberg 2010). Alguns d'aquests gens afecten processos clau del desenvolupament dels melanoblasts, altres regulen la diferenciació i supervivència dels melanòcits, altres són reguladors de processos que afecten la pigmentació (Yamaguchi *et al.* 2007), i d'altres en la morfogènesis dels seus pigments (Mills i Patterson 2009).

S'han realitzat diversos estudis per avaluar i identificar la base genètica de la presència de diferents colors en rèptils, però encara queda molt enfront dels amplis coneixements que es tenen en altres vertebrats, sobretot mamífers. Estudis realitzats a un tipus de serp, *Lampropeltis getulus californicae*, han demostrat que la presència de

diferents patrons de coloració tenen una herència mendeliana; però en canvi, investigacions dutes a terme en sargantanes sobre la base genètica de les coloracions observades, indiquen que es tracta d'un tret molt polimòrfic, amb una ampla variació entre sexes, i també entre individus d'un mateix sexe, compatible amb una herència poligènica (Olsson *et al.* 2013).

Tot i els nombrosos gens potencials, només uns quants han estat identificats com a contribuïdors en la variació del color a diversos grups taxonòmics (Hoekstra 2006). Diversos gens estan implicats en el canvi de síntesi dels diferents tipus de pigments (eumelanina i feomelanina) als melanòcits (Barsh 1996). Aquest canvi està controlat per la interacció de dos gens principals: el receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*), i el seu antagonista, *agouti signalling protein (ASIP)*, també conegut com *agoutí*. El treball de Protas i Patel (2008) hi implica en aquest pas, a més dels dos gens anteriors, la *MSH*. Però també s'ha demostrat la implicació d'altres gens en la síntesi de melanines com el *TYRP1* (tirosinasa relacionada amb la proteïna 1), la Tirosinasa (*TYR*), *OCA2* (proteïna transmembrana del melanosoma) i *MATP* (proteïna transportadora associada a membrana) (Hofreiter i Schoneberg 2010).

Dels gens implicats, hi ha participants clau que mereixen una especial atenció:

1.3.2.1. *MC1R*

Un dels gens que ha captat una major atenció ha estat el gen que codifica pel receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*). És un gen associat a proteïnes G, que regula la quantitat i qualitat de les melanines sintetitzades. En els humans està situat al cromosoma 16q24.3, i va ser el primer receptor de melanocortines identificat. L'expressió de l'*MC1R* es dona majoritàriament als melanòcits, encara que també s'ha observat la seva expressió a macròfags i cervell.

El seu producte, la *MC1R*, és una proteïna integral de membrana de 317 aminoàcids en humans i 315 en rates. També presenta les marques estructurals dels receptors associats a proteïnes G (GPCR), com per exemple, una regió extracel·lular N-terminal, set fragments/dominis transmembrana i una extensió intracel·lular C-terminal (García-Borrón *et al.* 2005). La longitud de la coa C-terminal és variable, i dins la subfamília de les melanocortines (*MCR*) és anormalment curta, amb només 14 aminoàcids a l'*MC1R* d'humans.

L'*MC1R* és una de les proteïnes clau que intervé en la regulació de la síntesi dels pigments i també ha estat relacionada amb els diferents patrons de pigmentació, els quals depenen del tipus, quantitat i distribució dels pigments. Degut a l'àmplia distribució d'aquest receptor, s'ha vist que està implicat en altres funcions biològiques, com antipirètiques i antiinflamatòries (Cooray i Clark 2011).

Les funcions de l'*MC1R* són controlades per: i) agonistes: les α MSH i les hormones adrenocorticotròpiques (ACTH), i per ii) un antagonista, l'ASIP. L'activació de l'*MC1R* per un agonista estimula l'expressió de la cascada melanogènica i, per tant, la síntesi de melanina. L' α MSH i l'ACTH regulen incrementant l'expressió del gen



MC1R, actuant en un bucle de retroalimentació positiva (Yamaguchi *et al.* 2007). L'hormona peptídica, α MSH, activa l'*MC1R*, la qual cosa provoca un increment en els nivells del monofosfat d'adenosina cíclic (AMPc) i un augment en la producció d'eumelanina (Nachman *et al.* 2003); pel contrari, la reducció de la seva activitat provoca una major síntesi de feomelanina (Kingsley *et al.* 2009). Mentre que amb la presència de la proteïna agoutí, l'activitat de l'*MC1R* és inhibida, els nivells d'AMPc es redueixen i els melanòcits s'aturen de produir eumelanina i comencen a sintetitzar feomelanina (Hoekstra 2006) (**Figura 36**). En absència de la proteïna agoutí, l'activitat basal de l'*MC1R* manté el nivell d'AMPc intracel·lular suficientment alt per activar la via de síntesi de les eumelanines.

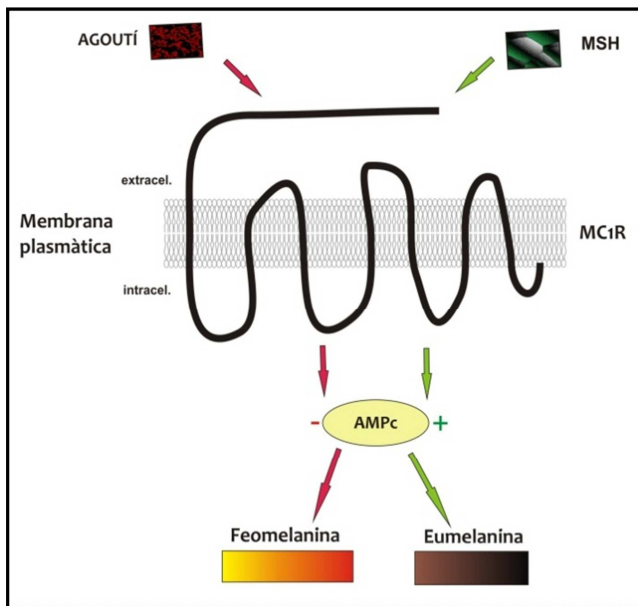


Figura 36. Regulació en la síntesi d'eumelanina i feomelanina.

El gen *MC1R* ha estat evolutivament molt conservat dins els vertebrats i té una estructura genètica relativament senzilla, que ha facilitat la seva identificació a diferents grups taxonòmics (Hoekstra 2006). La major part dels estudis han associat un polimorfisme de nucleòtid simple (SNP) i el seu corresponent canvi d'aminoàcid amb una coloració diferent (Hubbard *et al.* 2010). S'han descrit nombrosos casos que impliquen el gen *MC1R* com a la causa de variació de color, tant en espècies domèstiques com salvatges, i segurament és la proteïna més estudiada de totes les implicades en la pigmentació (Hofreiter i Schoneberg 2010). Les mutacions conegudes estan distribuïdes per tota la seqüència que codifica per la proteïna; s'han detectat tant mutacions diferents en espècies molt properes com mutacions idèntiques i en posicions homòlogues a diferent taxons que poden donar lloc al mateix fenotip o similars (Hubbard *et al.* 2010).

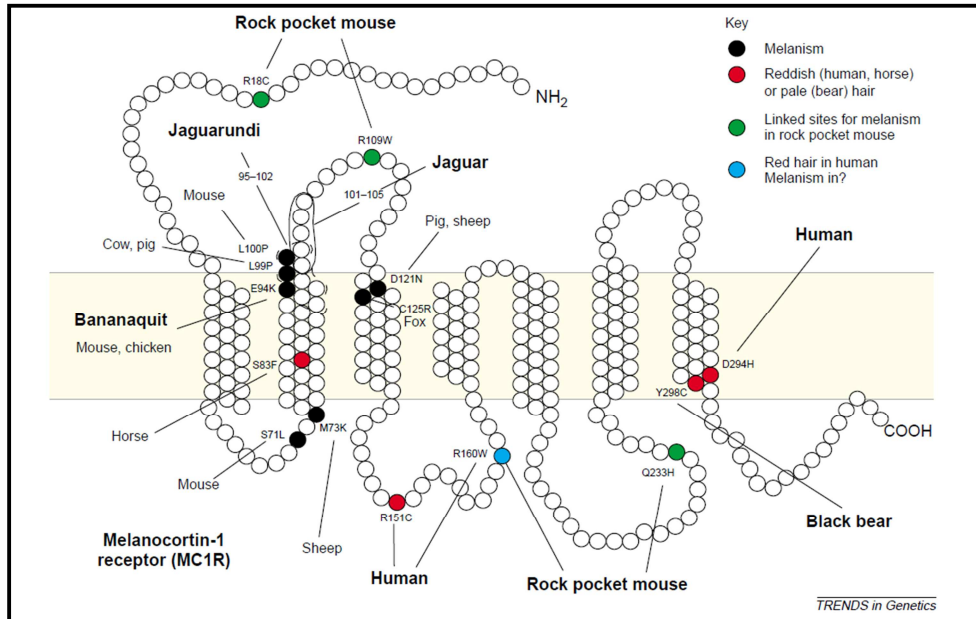


Figura 37. Canvis al gen *MC1R* associats a diferents coloracions. Font: Majerus i Mundy (2003).

La comparació de les mutacions de color a l'*MC1R* en animals domèstics revela alguns patrons interessants (Majerus i Mundy 2003) (**Figura 37**). En mamífers i ocells, s'ha demostrat que mutacions que inactiven el gen *MC1R* provoquen coloracions clares (major síntesi de feomelanines), pel contrari, mutacions amb guany de funció, causarien coloracions obscures (increment en la producció d'eumelanines) (Robbins *et al.* 1993; Takeuchi *et al.* 1996). Contràriament, en esquiroles una delecció al gen causa melanisme (McRobie *et al.* 2009); a les races canines Labrador i *Golden retriever* amb pelatges grocs (**Figura 38**), Everts *et al.* (2000), varen identificar un codó d'aturada prematura; en humans (Sturm 2009), la diversitat al·lèlica del gen mostra una relació directa amb el fenotip de pigmentació pell-roja i pell clara (Ito i Wakamatsu 2010); en cabres, mutacions en el mateix gen s'han relacionat amb pelatges negres i vermells, encara que no a totes les varietats, el que indica la importància d'altres factors genètics (Fontanesi *et al.* 2009). A més, mutacions en aquest gen són la causa de la presència de melanisme a rosegadors, *Chaetodipus intermedius* i *Peromyscus maniculatus* (Hoekstra i Nachman 2003; Majerus i Mundy 2003; Nachman 2005), i a jaguars (*Panthera onca*) i jaguarundis (*Herpailurus yaguarondi*) (Majerus i Mundy 2003).

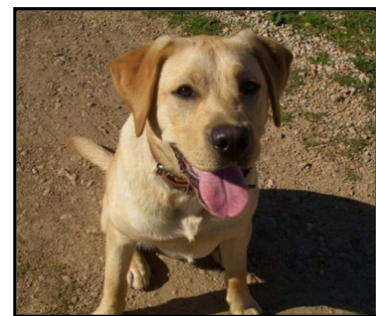


Figura 38. Pelatge daurat del Labrador. Font: Joana M. Buades.

En aus, el gen *MC1R* va ser clonat per primera vegada en pollastres i, posteriorment, es va trobar una substitució puntual que tenia relació amb el melanisme (Kerje *et al.* 2003). Guo *et al.* (2010) varen descriure un gran nombre de polimorfismes del gen al pollastre *Hebei*, tots ells relacionats amb la diversitat de colors al plomatge.



Un únic canvi no sinònim en aquest gen (encara que diferents substitucions hi estan també implicades) s'ha relacionat amb el melanisme a: la coereba (*Coereba flaveola*), l'oca de les neus (*Anser c. caerulescens*) i el paràsit cuapunxegut (*Stercorarius parasiticus*) (Mundy 2005).

En peixos, més concretament a l'espècie, *Poecilia reticulata*, Tezuka *et al.* (2011) trobaren una relació significativa entre la pigmentació negra i l'*MC1R*; encara que els resultats mostren que hi ha altres gens que modifiquen els efectes del gen *MC1R*. Pel contrari, estudis fets a *Midas cichlid*, mostren que no hi ha lligament entre el gen i el fenotip daurat (Henning *et al.* 2010).

Recentment s'han publicat alguns treballs sobre el melanisme en amfibis i rèptils, amb resultats controvertits. Mutacions independents al gen *MC1R* són les responsables de diferents fenotips blanquinosos a llargardaixos de *White sands* (Rosenblum *et al.* 2010), mentre que canvis a la seqüència de l'*MC1R* no expliquen les variacions del grau de melanisme en amfibis, grup en el qual aquesta coloració té una àmplia distribució (Herczeg *et al.* 2010).

1.3.2.2. *Agoutí*

La proteïna agoutí regula la pigmentació en els fol·licles pilosos de rates i produeix pèls negres amb una banda subapical groga. Aconsegueix el seu efecte impeding la unió de l' α -MSH a l'*MC1R*, i controlant la quantitat de melanines que regulen la síntesis entre l'eumelanina (negre/marró) i la feomelanina (groc/vermell) (Voisey i Van Daal 2002). El locus *agoutí* en rates es troba al cromosoma 2 (Kwon *et al.* 1994) i codifica una proteïna de 131 aminoàcids (aa). La regió N-terminal de la proteïna té un domini molt bàsic amb una elevada proporció de residus d'arginina i lisina. La darrera regió desemboca en una regió rica en prolina que és immediatament precedida pel domini C-terminal ric en cisteïna. La proteïna agoutí es localitza principalment a les cèl·lules dèrmiques papil·lars, a més, s'ha demostrat que inhibeix la diferenciació i proliferació dels melanoblasts (Cerdeira-Reverter *et al.* 2005). L'agoutí mostra característiques estructurals d'una proteïna secretora, en base a una seqüència senyal hidrofòbica i per la falta de dominis transmembrana (Dinalescu i Cone 2000).

El gen *agoutí* ha estat mapejat i aïllat a un cert nombre d'espècies, per exemple al ratolí. L'homòleg de l'*agoutí* en humans, s'anomena *ASIP*, es troba al cromosoma 20 i codifica una proteïna de 132 aminoàcids. A pesar de l'elevat grau d'homologia entre les proteïnes (80 % d'aminoàcids idèntics amb rates) el patró d'expressió és un poc diferent (Voisey i Van Daal 2002). L'*ASIP* va ser descrita el 1997 per la capacitat d'inhibir l'eumelogenèsi als melanòcits humans on té un ampli patró de distribució, expressant-se al teixit adipós, testicles, ovaris, cor, i en menor proporció al prepuci, ronyons i fetge (Scherer i Kumar 2010).

La gran part del nostre coneixement sobre l'estructura i funció de la proteïna agoutí prové dels estudis realitzats amb rosegadors (Dinalescu i Cone 2000). En aquest grup el gen *agoutí* s'expressa només a la pell. L'organització genòmica del gen *agoutí* en els murins (família de rosegadors) és complexa. Se n'han identificat uns 50 al·lels

diferents (Bultman *et al.* 1992). L'estudi realitzat per Vrieling *et al.* (1994) es basa en les diferències de pigmentació ventral i dorsal de ratolins causades per aquests distints al·lels, i indica com la complexitat genètica de l'*agoutí* és deguda a l'existència de diversos elements reguladors que provoquen l'aparició de diferents isoformes de l'ARNm d'aquest gen. L'expressió de l'*agoutí*, en ratolins, està regulada de forma temporal i regional per crear una distribució diferencial dels pigments groc i negre a un mateix pèl i per tot el pelatge. Aquest gen està format per tres exons codificants anomenats 2, 3 i 4 i també per 4 exons que no es tradueixen, 1A, 1A', 1B i 1C, situats corrent amunt del gen. Com hem dit, el complicat patró de regulació del gen es deu a l'existència d'un *splicing* alternatiu; els transcrits difereixen en els exons no traduïts de l'extrem 5', i estan controlats per dos grups d'elements controladors. Els transcrits de tipus I contenen els exons no codificants 1B i 1C i estan regulats per elements temporals (com per exemple el cicle capil·lar). Per una altra banda, els transcrits de tipus II contenen els exons no codificants 1A i 1A' i estan sota el control d'elements promotors regionals, més concretament els específics de la regió ventral (Dinalescu i Cone 2000). Els de tipus I estan relacionats amb la presència de bandes subapicals grogues presents a tot el pèl corporal; mentre que el de tipus II és el causant de la presència d'una pigmentació ventral més clara. Els fenotips d'*agoutí* provenen d'una única seqüència codificant regulada per diferents promotors que controlen el color del pelatge dorsal i ventral de forma independent (Voisey i Van Daal 2002).

El color recessiu negre del pelatge de moixos domèstics està relacionat amb una deleció de 2 pb a l'exó 2 del gen *agoutí* (Majerus i Mundy 2003). També mutacions en aquest gen s'han relacionat amb el melanisme al rosegador *Peromyscus*, més concretament, una deleció de 125 kb a les poblacions de New Hampshire i la presència d'un codó d'aturada prematura als individus procedents de poblacions d'Alaska (Kingsley *et al.* 2009).

1.3.2.3. ALTRES GENS IMPLICATS

Un nombre creixent d'estudis tant en animals domèstics com salvatges han demostrat que un cert nombre d'altres gens implicats en la pigmentació, al principi identificats en rates de laboratori, també juguen un paper important en la determinació de variants de color a poblacions de vertebrats domèstiques i naturals (Hubbard *et al.* 2010). D'aquests gens, dos dels més estudiats són la *TYR* i la *TYRP1*.

Tirosinasa (TYR)

És el més important del grup d'enzims implicats en la melanogènesi. És un enzim depenent del coure, que catalitza les dues primeres etapes de la melanogènesi, per això, és el responsable de regular tant la velocitat com l'especificitat del procés. La proteïna és imprescindible en la síntesi dels dos pigments de la melanina (eumelanina i feomelanina). Una activitat basal de l'enzim provoca la síntesi de feomelanina, mentre que un increment de l'activitat proteica provoca un gir cap a la síntesi d'eumelanina. Hi ha estudis que descriuen que la tirosinasa mostra una activitat enzimàtica més alta en ambients neutres que en condicions d'acidesa (Scherer i Kumar 2010). Mutacions que impliquin pèrdua de funció, provoquen entre altres efectes, albinisme (Hofreiter i Schoneberg 2010).



Proteïna 1 associada a la tirosinasa (TYRP1)

Aquesta proteïna codifica un enzim melanogènic implicat en la producció d'eumelanina. Variacions en la seqüència de la *TYRP1*, han estat associades amb la diversitat de coloració en diversos animals domèstics (com cans, moixos i bestiar), i també en poblacions de perdis de laboratori (Hubbard *et al.* 2010), mentre que en humans, mutacions en aquesta proteïna produeixen albinisme oculacutani tipus 3 (*OCA3*) (Simeonov *et al.* 2013).

1.3.3. Expressió gènica i transcriptoma

En els darrers anys, i complementant els estudis mutacionals en aquests gens, s'han realitzat anàlisis d'expressió gènica, sobretot al gen *MC1R*, que han donat resultats diversos. No s'han trobat canvis d'expressió en macacos (Bradley *et al.* 2013), ovelles (Peñagaricano *et al.* 2012), cans mapatxes (Han *et al.* 2012), i pollastres (Zhang *et al.* 2015). En canvi, sí que s'observaren canvis d'expressió en: la guàtlera del Japó, amb una major expressió d'agoutí als individus amb plomatge marró, i una major expressió de l'*MC1R* als de plomatge negre (Zhang *et al.* 2013); en pollastres melànics amb un increment de l'agoutí (Zhang *et al.* 2015) i en l'espècie *Podarcis siculus*, amb una major quantitat d'ARNm de l'*MC1R* a individus obscurs (Fulgione *et al.* 2015).

Cal dir que també s'han investigat altres gens implicats en la pigmentació com l'*ASIP*, sense trobar relació en macacos (Bradley *et al.* 2013), ni en ovelles (Peñagaricano *et al.* 2012), però en canvi sí que pareix que hi ha relació en pollastres (Zhang *et al.* 2013, 2015). Estudis en dues subespècies de ratolins (*P. p. subgriseus* i *P. p. leucocephalus*) observaren com la interacció entre l'*agoutí* i l'*MC1R* era la responsable de la coloració clara, degut a mutacions a la seqüència de l'*MC1R* (però sense observar canvis d'expressió) juntament amb el gen *agoutí* que incrementa la seva expressió, però no canvis a la seqüència (Steiner *et al.* 2007).

Els darrers avanços en genòmica (per exemple, els perfils transcriptòmics) permetran ampliar els coneixements que es tenen fins a dia d'avui, la qual cosa ajudarà a interpretar els canvis que han sofert els patrons de coloració al llarg de la història evolutiva. L'anàlisi del transcriptoma permet identificar els gens que s'expressen, i permet relacionar la seva presència amb processos metabòlics amb característiques fenotípiques. Entre els estudis realitzats destacarem els següents: i) Fan *et al.* (2011), que a partir de la pell d'alpaques blanques obtenen els gens que s'expressen més i per tant, poden tenir un paper potencial en la pigmentació d'aquests individus. Dels diferents gens que es coneixien que participen en la coloració, en alpaques se'n van identificar l'expressió de 10, entre els que destaquem l'*MC1R*; ii) el transcriptoma en ovelles (Fan *et al.* 2013), que revelà que alguns d'aquests gens (*TYR* i *TYRP1*, entre d'altres) tenien una major expressió en les ovelles negres enfront de les blanques; iii) per altra banda, estudis fets a pollastres (Zhang *et al.* 2015), comparant individus blancs i negres, on *agoutí* i *TYR* mostraren una major expressió a melànics, mentre que sorprenentment no es va observar canvi d'expressió a l'*MC1R* entre individus d'ambdues coloracions i iv) l'anàlisi del perfil transcriptòmic d'un tipus de peix (*P. fulvoidraco*) comparant l'expressió entre els individus 'normals' i els albins va permetre

identificar diversos gens, entre els que destacarem la *TYR* i *TYRP1*, que presentaven una major expressió als albins.

Analitzant els resultats obtinguts a un important ventall d'espècies i emprant diferents mètodes d'estudi (canvis a les seqüències, expressions diferencials, diferències estructurals i anatòmiques de les capes pigmentàries, entre d'altres) es pot observar com la pigmentació està formada per nombroses rutes metabòliques on intervien un destacat nombre de gens (**Figura 39**), per la qual cosa identificar la base de la coloració és una tasca complexa.

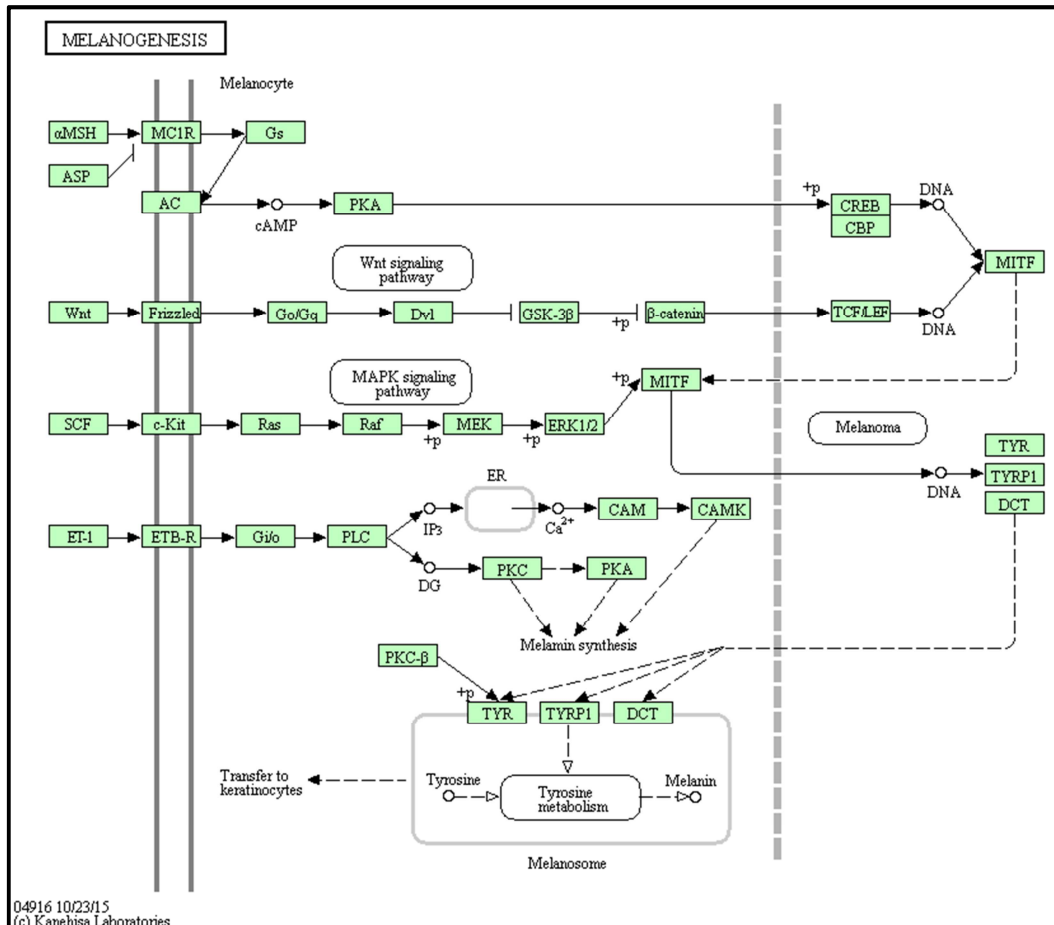


Figure 39. Ruta de la melanogènesi. Font: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=acs&mapno=04916&mapscale=&show_description=show.

2. OBJECTIUS

Els estudis de variabilitat genètica poblacional han utilitzat majoritàriament l'ADN mitocondrial com a marcador evolutiu. El gens nuclears, amb els seus introns i exons, han estat recentment incorporats a aquests estudis, però la gran diversitat mostrada pels introns els ha fet poc útils en la majoria dels casos. Així, aquesta tesi doctoral es va plantejar l'estudi de la variabilitat en la seqüència i en l'expressió de diversos exons de les sargantanes del gènere *Podarcis*, centrant-se en dos principals problemes evolutius:

- 1) La presència de poblacions melàniques i no melàniques.
- 2) La filogènia i filogeografia de les espècies del gènere *Podarcis* que viuen a Còrsega i Sardenya i a les Columbretes.

Els nostres objectius en abordar el melanisme (problema 1) són:

- a. Obtenir la seqüència del gen *MC1R* i analitzar la seva diversitat a nivell de poblacions insulars melàniques i no melàniques a les espècies *P. lilfordi* i *P. pityusensis* per tal de detectar canvis que es relacionin amb el melanisme.
- b. Estudiar si canvis d'expressió en aquest gen estan implicats en la presència de melanisme en aquestes espècies.
- c. Investigar la implicació d'altres gens relacionats amb la coloració, com el gen *agouti*, en aquestes espècies. Ampliar la detecció dels canvis d'expressió a la totalitat de l'exoma.

En el cas del segon problema plantejat els nostres objectius són:

- a. Determinar el nivell de variabilitat genètica, l'estructura poblacional i obtenir la datació dels principals successos cladogenètics a l'espècie *P. tiliguerta*, en base a exons nuclears i correlacionar-ho amb les dades obtingudes a nivell d'ADNmt.
- b. Donada la confusa situació taxonòmica de l'espècie *Podarcis* que viu a les illes Columbretes, establir la seva relació filogenètica amb altres espècies del gènere de la Península Ibèrica, especialment dins el grup de *P. hispanica*.

3. MATERIAL I MÈTODES

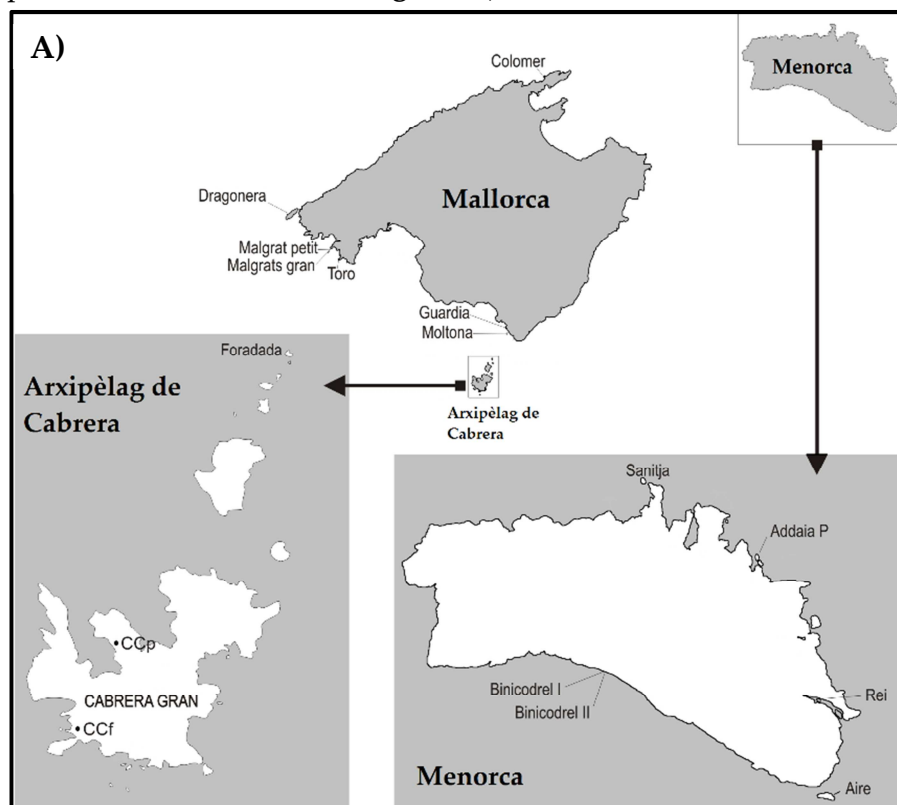
3.1. SEQÜENCIACIÓ D'EXONS DE GENS NUCLEARS

3.1.1. Mostres

S'han analitzat un total de 192 individus de diferents espècies del gènere *Podarcis* pertanyents a distintes poblacions.

Les mostres emprades per a aquest estudi s'obtingueren de la coa dels individus. Després d'aconseguir-ne un petit fragment, tots els individus s'alliberaren al mateix lloc on havien estat capturats. Les sargantanes regeneren de forma espontània la coa, capacitat coneguda com tautomerització. Els fragments foren conservats en vials amb alcohol absolut refrigerats a 4 °C.

1. En les anàlisis de la diversitat del gen *MC1R* a les espècies melàniques i no melàniques de les Illes Balears s'obtingueren 72 mostres procedents de:
 - a) 46 individus de l'espècie *Podarcis lilfordi* de les següents poblacions (**Figura 40A**): d'illes de Menorca (Addaia Petita, Aire, Binicodrell Gran (I) i Petit (II), Rei i Sanitja), arxipèlag de Cabrera (Cabrera Gran (zones del far i del port) i Foradada) i d'illes de Mallorca (Colomer, Dragonera, El Toro, Guàrdia, Malgrats (Gran i Petit) i Moltona).
 - b) 22 individus de l'espècie *P. pityusensis* de 14 poblacions (**Figura 40B**): d'Eivissa (St. Josep de sa Talaia i Sant Joan de Labritja), i d'algunes de les seves illes: Alga, Bleda Plana, Bosc, Conillera, Dau Gran, Espalmador, i Espartar i de Formentera (Cap Barberia, Punta Trocadors, Sa Pujada i Sant Francesc Xavier).
 - c) Individus emprats com a *outgroups* procedents d'altres espècies: una mostra de *P. filfolensis* (Comino, arxipèlag maltès) (**Figura 40C**) i tres mostres de *P. tiliguerta* (Foradada, Paduleddi i Stramanari, a Sardenya, corresponents a les poblacions 29, 30 i 31, de la **Figura 41**).



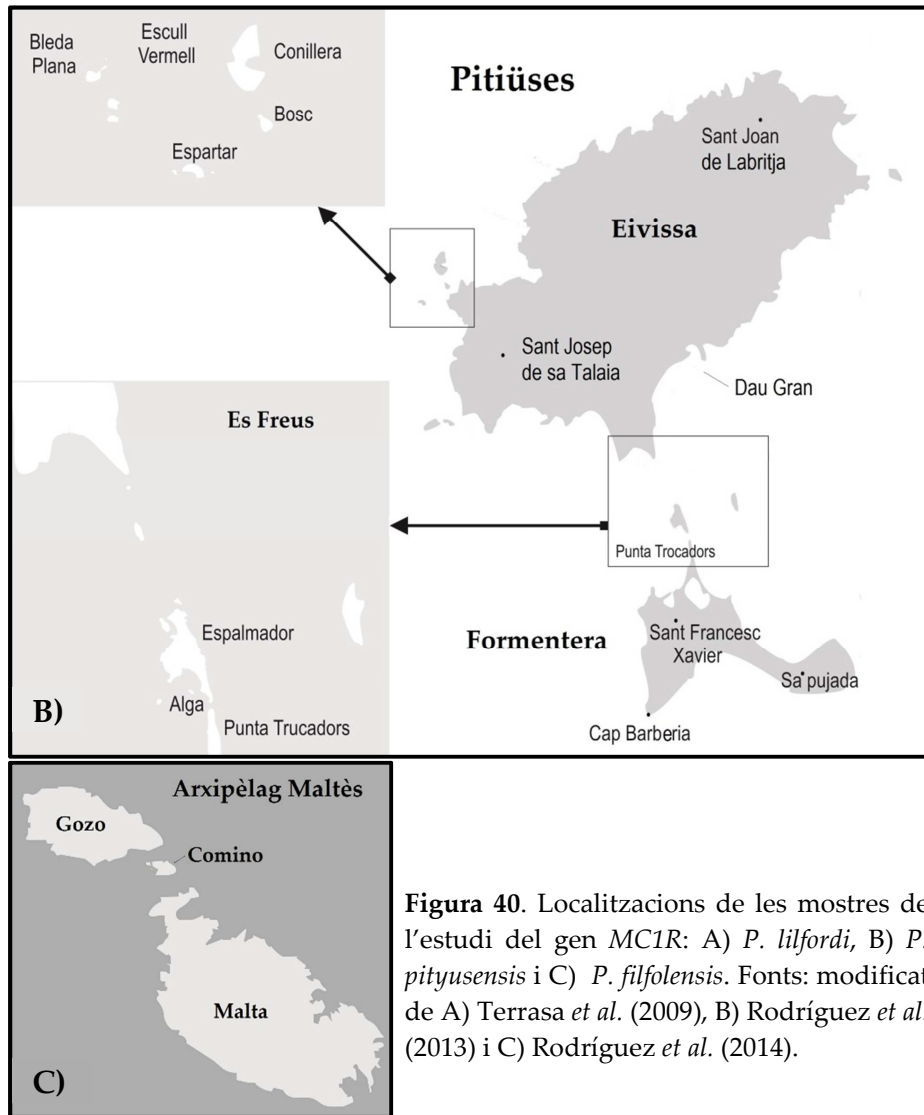


Figura 40. Localitzacions de les mostres de l'estudi del gen *MC1R*: A) *P. lilfordi*, B) *P. pityusensis* i C) *P. filfolensis*. Fonts: modificat de A) Terrasa *et al.* (2009), B) Rodríguez *et al.* (2013) i C) Rodríguez *et al.* (2014).

2. Per a l'estudi de la diversitat i la filogènia de l'espècie *P. tiliguerta*, endèmica de Còrsega i Sardenya, es varen recollir 41 individus (**Figura 41**):
 - a) 19 mostres en 15 localitats de Còrsega (Bonifacio¹, Sartène², Filitosa³, Sant Bastiano⁴, Les Chalanges⁵, Casa Vecchia⁶, L'Île Rousse⁷, Pietra Moneta⁸, Corte⁹, Vivario¹⁰, Ghisonaccia¹¹, Ribba¹², Casteddu d'Araghju¹³, Chera¹⁴ i La Trinité¹⁵).
 - b) 14 individus procedents de 13 localitats de l'illa italiana de Sardenya (Gallura¹⁶, Romanzesu¹⁷, Dorgali¹⁸, Su Gologone¹⁹, Fonni²⁰, Flumendosa lake²¹, Costa Rei²², Villasimius²³, Locanda dil Parco²⁴, Fluminimaggiore²⁵, Narbolia²⁶, Nuraghe Sorradile²⁷ i Nuraghe Nuradeo²⁸).
 - c) 8 individus de 4 illes/illots de Sardenya (Molara³², Foradada²⁹ i de l'arxipèlag de La Maddalena: Paduleddi³⁰ i Stramanari³¹).

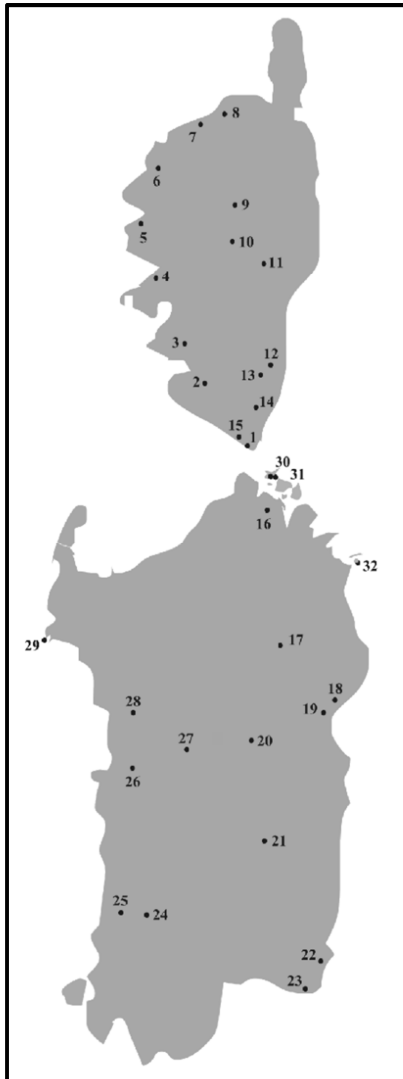


Figura 41. Localitzacions de les mostres recollides de *P. tiliguerta*. Font: modificat de Rodríguez *et al.* (2017).

3. En les anàlisis de les espècies de la Península Ibèrica, *P. muralis* i el complex *P. hispanica* van ser obtinguts un total de 82 individus (**Figura 42**):
 - a) 31 individus de *P. muralis* de 10 poblacions (Senda del Oso a prop de Proaza¹, Grávita², Villaviciosa³, San Celorio⁴, Pendueles⁵, San Vicente de la Barquera⁶, Port San Glorio⁷, Cervera de Pisuerga⁸, Pirineus⁹ i La Pinilla¹⁰).
 - b) 22 espècimens de *P. liolepis* procedents de les illes de l'arxipèlag de Columbretes¹¹: Grossa, Foradada, Mancolibre i Lobo; i de Penyagolosa¹²: l'ermita de Sant Joan i la font, Pirineus¹³ i Sazajarra¹⁴.
 - c) 27 individus de diverses poblacions de *P. hispanica*: a Soria¹⁵: Tiermes i a prop del riu Pedro, Burjassot¹⁶, Doña Blanca a Don Benito¹⁷, Aranjuez¹⁸, Dehesa de la Golondrina a Navacerrada¹⁹, Valle de la Fuenfría a Cercedilla²⁰, Pedrezuela²¹, de la regió de Salamanca²² (Cabrerizos, Escorial de la Sierra, Los Santos i Mogarraz), i de La Baña²³ a León).
 - d) 1 individu de *P. bocagei* de La Baña²⁴ (León)
 - e) *Iberolacerta galani* 1 espècimen de La Baña²⁵ (León).



Figura 42. Localització de les mostres de *P. muralis* i del complex *P. hispanica*.

3.1.2. Extracció ADN

Per a l'extracció de l'ADN genòmic total, a partir dels fragments de coa, es va seguir un protocol estàndard de fenol-cloroform (González *et al.* (1996), amb petites modificacions):

- Es posaren els fragments de coa en aigua destil·lada durant 1 hora, per eliminar els residus d'alcohol del teixit.
- Per homogeneïtzar el teixit, es va trossejar la coa en làmines molt fines i s'hi afegiren 4 ml de tampó de lisi pH 8 (compost per: Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, Igepal CA-630 0,45 % i Tween20 0,45 %). A continuació, es va disgregar el teixit, amb l'efecte dels detergents del tampó i amb l'ajuda d'un homogeneïtzador.
- Per mostra es van afegir: 500 µl de dodecil sulfat sòdic (SDS) al 20 % i 10 µl de proteïnasa K, per la lisi cel·lular. Després es va incubar a 55 °C durant 4 hores o 37 °C tot el vespre o *overnight* (o/n).
- La purificació de l'ADN constava de tres centrifugacions a 3000 rpm durant 10 minuts (es va recollir el sobrenedant):



primer s'hi va afegir volum per volum (v/v) de fenol; També s'hi va afegir v/v de fenol-cloroform/isoamílic (25:24:1) i per acabar, a les mostres s'hi afegien v/v de cloroform/isoamílic (24:1). D'aquesta manera es van eliminar restes lipídiques i proteiques de la mostra.

- e) Per la precipitació es va afegir clorur sòdic (NaCl) 5 M (400 µl per cada 5 ml de mostra) i v/v d'etanol absolut, i es va deixar a -20 °C o/n. Posteriorment, es va centrifugar a 4000 rpm durant 20 minuts. A continuació, es va decantar la fase líquida i s'hi van afegir 3 ml d'etanol al 70 % i a -20 °C. Finalment, es va centrifugar 10 minuts, es va decantar la fase líquida i es van posar les mostres a la bomba de buit durant 30 minuts, aproximadament. L'ADN es va resuspendre en 100 µl d'aigua Milli-Q.

Les extraccions es van quantificar amb el quantificador NanoVue Plus™ (GE healthcare, Chicago EUA) i, es van realitzar alíquotes a 80 ng/µl per a les anàlisis posteriors.

3.1.3. Amplificació i purificació

Es va amplificar un fragment de cadascun dels 6 gens nuclears: *MC1R*, *RAG*, *APOBE28*, *BLC9L*, *KIAA2018* i *KIF24*. Els encebadors (o *primers*) utilitzats per a cada un dels gens anteriors i les condicions de PCR s'especifiquen a les **Taules 2 i 3**.

Taula 2. Encebadors emprats per amplificar els diversos exons de gens nuclears.

| Gen | Encebador | Seqüència 5'→ 3' | Referència |
|-----------------|------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <i>MC1R</i> | MC1R-PF | GGCNGCCATYGTCAANAACCGGAACC | Buades <i>et al.</i> (2013) |
| | MC1R-PR | CTCCGRAAGGCRTAAATNATGGGGTCCAC | |
| | MC1R-mF | ATGTCTGTGCCATCACCCCT | |
| | MC1R-PmR | GTGGACCCCATCATTACGC | |
| <i>RAG1</i> | RAG-f | GAAAAGGGCTACATCCTGG | Mayer i Pavlicev (2007) |
| | RAG-r | CCACTTATTGCTTTTACAGTC | |
| <i>APOBE28</i> | APOBE28 F | TGCGGGAGGAATAYTTTGA | Rodríguez <i>et al.</i> (2017) |
| | APOBE28 R | TCTATTCTRAGCTCTCCTTSRCGAA | |
| <i>BLC9L</i> | BLC9L F | TGGATCCA KCCATGTTTGCTGGG | Rodríguez <i>et al.</i> (2017) |
| | BLC9L R | GGCGTCTGCGGGGACTTGAG | |
| | BLC9L FN | CGCTGCGGGACATGGAG | |
| | BLC9L RN | GTTGGCGGAAGGGGAGGTGC | |
| <i>KIAA2018</i> | KIAA2018 F | CCCATCCYTACCTATGCAGCCATTA | Rodríguez <i>et al.</i> (2017) |
| | KIAA2018 R | TGCCAGCCATTTGTGATATGCTYTGA | |
| <i>KIF24</i> | KIF24 F | AAACGTRTCTCCMAAACGCATCC | Rodríguez <i>et al.</i> (2017) |
| | KIF24 R | GGCTGCTGRAAYTGCTGGTG | |



El volum de la reacció era de 25 μl i els reactius emprats eren: entre 20-80 ng d'ADN, Tampó 1x (amb 1,5 mM de MgCl_2), 0,4 mM de cada dNTPs, el volum dels encebadors varia en funció del gen (*MC1R*: 0,3 μM , *RAG1*: 0,4 μM i la resta 0,16 μM) i 0,5 U de Taq polimerasa Dynazyme II (Thermo Fischer Scientific S.L., Massachusetts, EUA). A totes les PCR es van incloure controls negatius.

Per tal de comprovar que l'amplificació fos la correcta, es realitzaren electroforesis en gels d'agarosa a l'1 o al 2 % (en funció de la resolució que es necessitava). Posteriorment es visualitzaren amb llum ultraviolada a l'aparell MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

Després es varen purificar les mostres amb el *MSB® Spin PCRapace kit* (Invitex, Berlín, Alemanya). Aquest pas permet eliminar les restes de productes de la PCR (nucleòtids, encebadors, etc.). El protocol a seguir, comú per a qualsevol PCR amb un volum de fins 50 μl , era:

- a) Afegir a cada mostra 250 μl de *binding buffer* i mesclar pipetejant bé.
- b) Transferir la mescla al tub amb membrana de sílice i centrifugar 3 minuts a 12.000 rpm. El tampó permet la unió al filtre de fragments d'ADN d'entre 70 pb - 30 kb, i elimina components no desitjats (dNTPs, encebadors, etc).
- c) Afegir 15 μl d'*elution buffer*, i incubar 5 minuts a temperatura ambient i centrifugar 1 minut a 10.000 rpm.
- d) L'ADN, es conservà a -20 °C fins a la seva utilització.

Taula 3. Condicions d'amplificació per a cada gen.

| Gen | Desnaturalització inicial | | Cicles | Desnaturalització | | Annealing | | Extensió | | Extensió final | |
|-----------------|---------------------------|-------|--------|-------------------|-------|-----------|-------|----------|-------|----------------|-------|
| | Ta (°C) | t (m) | | Ta (°C) | t (s) | Ta (°C) | t (s) | Ta (°C) | t (s) | Ta (°C) | t (m) |
| <i>MC1R</i> | 92 | 5 | 40 | 92 | 30 | 56 | 30 | 72 | 90 | 72 | 5 |
| <i>RAG</i> | 94 | 2 | 35 | 95 | 10 | 52 | 15 | 72 | 50 | 72 | 7 |
| <i>APOBE28</i> | 95 | 2 | 35 | 95 | 35 | 49-60 | 35 | 72 | 95 | 72 | 5 |
| <i>BLC9L</i> | 95 | 2 | 35 | 95 | 35 | 50-55 | 35 | 72 | 95 | 72 | 5 |
| <i>KIAA2018</i> | 95 | 2 | 35 | 95 | 35 | 50-58 | 35 | 72 | 95 | 72 | 5 |
| <i>KIF24</i> | 95 | 2 | 35 | 95 | 35 | 50-60 | 35 | 72 | 95 | 72 | 5 |



3.1.4. Seqüenciació i precipitació

Les mostres, una vegada purificades, es van quantificar amb l'espectrofotòmetre NanoVue Plus™ (GE healthcare, Chicago, EUA). La concentració d'ADN que es necessita per a la reacció de seqüenciació varia en funció de la longitud del fragment que es vol amplificar.

La reacció de seqüenciació es va realitzar per a cada una de les cadenes i en base a la tècnica de Sanger *et al.* (1977). La PCR per a la reacció, amb un volum de 10 µl, contenia: tampó 5X i Premix del *BigDye® Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.2 µM d'encebador i ADN purificat. Les condicions de PCR eren les següents (són idèntiques per a qualsevol amplificació): pre-desnaturalització 95 °C 5 minuts, 25 cicles: de la desnaturalització a 95 °C 45 segons, un *annealing* a 63 °C 30 segons i una elongació a 72 °C 30 segons i una desnaturalització final de 72 °C 10 minuts.

A continuació, els productes de la reacció es van precipitar amb etanol, seguint les següents passes:

- a) Per a cada mostra es va preparar una *mix* de: 50 µl d'etanol absolut fred i 2 µl d'acetat sòdic 3 M. Es van centrifugar 30 minuts a màxima velocitat i es va eliminar el sobrenedant.
- b) Es van afegir 100 µl d'etanol fred al 70 % i es va centrifugar 10 minuts a màxima velocitat. Després es va eliminar el sobrenedant.
- c) Les mostres es van eixugar a la bomba de buit.
- d) Finalment, es van conservar a -20 °C.

Posteriorment, les mostres es van resuspendre en 20 µl d'aigua Milli-Q autoclavada i es van analitzar al seqüenciador genètic 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.1.5. Mètodes per a l'anàlisi de dades

1. Edició de les seqüències

Els electroferogrames (**Figura 43**) i les seqüències obtingudes del seqüenciador es van revisar i editar amb el programa BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall 1999). Finalment, a partir de les seqüències úniques de cada individu es va obtenir un alineament global per a cada un dels gens.

Les seqüències obtingudes per a cada gen es troben dipositades a la base de dades, GenBank.

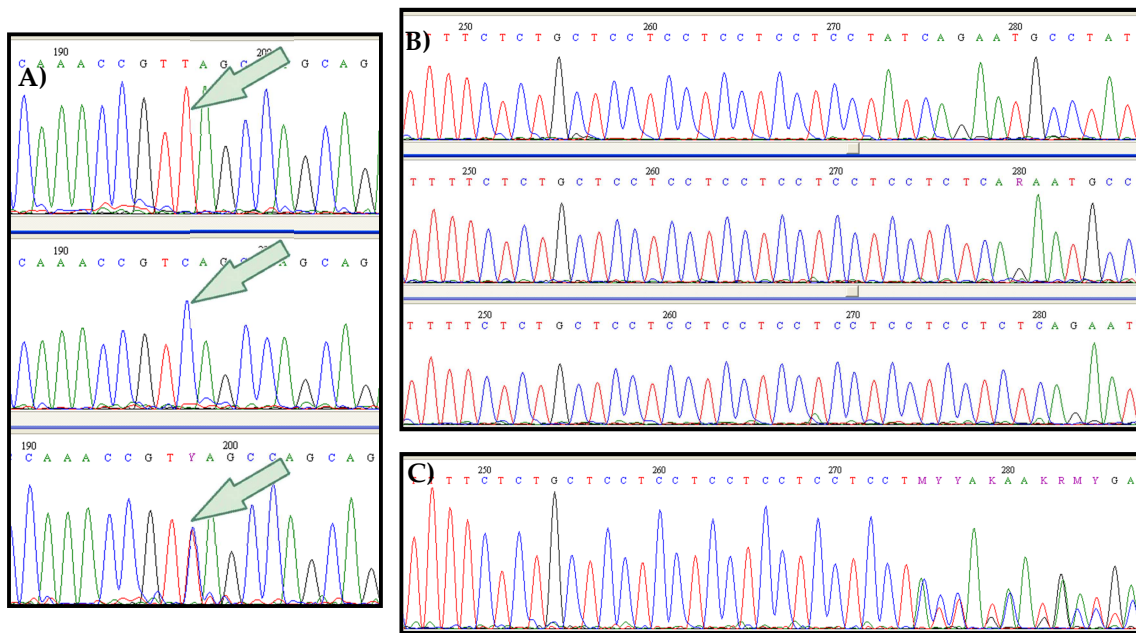


Figura 43. Electroferogrames obtinguts del gen *KIAA2018*: A) Posició heterozigòtica, B) Mostres amb diferents repeticions de l'STR amb la repetició de CCT, C) Individu heterozigot per l'STR anterior, amb el genotip 6-7.

2. Anàlisi de la diversitat genètica

Els programes emprats per poder calcular els paràmetres de diversitat genètica han estat el DnaSP v.5.10.01 (Librado i Rozas 2009) i el MEGA v.4 (Tamura *et al.* 2007).

Prèviament als càlculs, les mostres d'ADNn s'havien d'analitzar amb l'algoritme PHASE v2.1 (Stephens *et al.* 2001; Stephens i Donnelly 2003), present al DnaSP, que permet analitzar posicions polimòrfiques (de dues o més variants) i reconstruir els haplotips de cada mostra, de tal manera que partint d'una mostra amb diverses posicions heterozigòtiques, finalment es generen dues seqüències amb totes les posicions homozigòtiques.

De les dades es van obtenir els següents valors: nombre de seqüències (N), nombre de posicions variables (S), nombre d'haplotips (h), diversitat haplotípica (Hd), mitjana del nombre de diferències entre dues seqüències (K) i la diversitat nucleotídica (Pi).

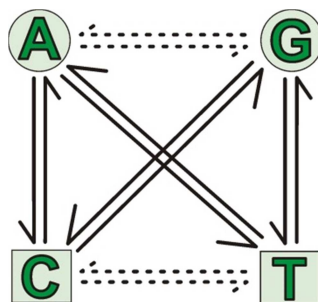
Es va analitzar l'existència de recombinació amb el test *Pairwise Homoplasmy Index* (phi) (Bruen *et al.* 2006) implementat dins el programa SplitsTree v. 4 (Huson i Bryant 2006).



3.1.6. Anàlisi de l'estructura poblacional i filogenètica

Els models evolutius són aquells que es basen en la probabilitat de canvi de cada una de les posicions nucleotídiques, és a dir, descriuen de quina forma pot canviar una seqüència al llarg del temps. Els més de 200 models evolutius existents es basen principalment en:

- i. La freqüència de cada nucleòtid (π): hi ha des de models que presenten la mateixa per a tots els nucleòtids, a d'altres més complexos on varia per a cada un.
- ii. Tipus i taxes de substitució (*rate parameters* o μ): indiquen la probabilitat de canvi d'un nucleòtid a un altre en un moment determinat.



Els models evolutius són la base en la qual es fonamenta qualsevol programa per poder realitzar un arbre filogenètic. De manera que emprar diversos models evolutius ens pot generar diversos arbres filogenètics i si, tenim en compte que són models teòrics i, segurament, les nostres mostres no hauran seguit exactament cap dels models descrits, és molt important escollir el model evolutiu més adequat. Per aquesta raó, s'han emprat distints programes: jModelTest (Guindon i Gascuel 2003; Darriba *et al.* 2012) i el PartitionFinder (Lanfear *et al.* 2012) per veure quin model s'ajusta millor al canvi realment produït. El segon programa, a més, també indica les millors particions en funció de les dades.

Una vegada seleccionat el millor model evolutiu, es varen elaborar els arbres filogenètics a partir del paquet de programes que conformen el *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees* o BEAST v. 1.8.2. (Drummond *et al.* 2012). Tenen com a base els algorismes de les MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) per poder, a partir d'alineacions de seqüències, reconstruir la filogènia i obtenir els arbres basats en la màxima coalescència. Cal destacar la característica que té de datar i calibrar els arbres proposats amb la màxima probabilitat posterior.

L'arxiu de partida (*input file*) del BEAST té el format .XML, i es crea en el BEAUTi, programa on s'especifiquen les característiques moleculars de les dades a analitzar (model de substitució, particions, rellotge molecular, MCMC, entre d'altres). Al BEAUTi es pot seleccionar una aplicació, l'*BEAST (Heled i Drummond 2010), que és específica per a la inferència Bayesiana d'arbres d'espècies a partir de dades de múltiples gens. És a dir, està indicat per generar arbres filogenètics a partir de seqüències de diversos *loci* que provenen de diferents individus d'espècies relacionades.

Els diversos gens nuclears estudiats (*MC1R*, *RAG1*, *BLC9L*, *APOBE28*, *KIAA2018* i *KIF24*) s'analitzaren com a particions independents entre elles. Es determinà el model evolutiu adient per a cada una de les particions anteriors. A més, el rellotge molecular es calibrà amb la separació de les espècies *P. lilfordi* i *P. pityusensis* (fet que va coincidir amb la MSC), es va seleccionar una distribució N (5.324, 0.0001). El nombre de generacions oscil·là entre 200.000 - 400.000 milions (en funció de les dades), i es va mostrejar cada 10.000.

Posteriorment a l'anàlisi, els resultats obtinguts es visualitzaren amb el programa TRACER v 1.6., de tal manera que es va poder comprovar si l'anàlisi havia convergit i les dades obtingudes eren adequades (*Effective sample Size* o ESS > 200). Si eren òptims, s'emprava el TREEANNOTATOR, per eliminar el *burnin* (nombre d'arbres inicials per eliminar), el qual per defecte és un 10 % del total dels arbres obtinguts. I seleccionarem l'arbre amb el *Maximum clade credibility tree*, arbre amb la màxima probabilitat posterior per a tots els seus nodes. El programa LogCombiner s'emprava per combinar els arxius resultants (formats: .trees. i .log) de les diferents corregudes (*runs*) realitzades amb el mateix conjunt de dades (s'empra el mateix arxiu de partida o .xml al BEAST). Finalment, l'arbre definitiu es va poder obrir al FigTree v. 1.4.2., aplicació per a la visualització de la filogènia i per a l'edició de la figura.

Altres programes emprats en l'anàlisi de l'estructura poblacional i filogenètica:

1. Es va emprar el programa TCS (Clement *et al.* 2000) per a poder analitzar les relacions entre els diferents haplotips obtinguts, amb la finalitat de crear una xarxa filogenètica (en base a criteris de parsimònia descrits per Templeton *et al.* (1992) i amb un límit de probabilitat del 95 %).
2. El *Bayesian Analysis of Population Structure* o BAPS (Corander *et al.* 2003; Corander i Tang 2007) (**Figura 44**), permet obtenir una predicció de l'estructura genètica d'una població, és a dir, ens mostra els diferents grups o *clusters* genèticament diferents que hi ha a la població analitzada i els individus que formen cada un d'ells. Aquesta anàlisi es fonamenta en models Bayesianes i, dona l'opció d'emprar la variabilitat observada en seqüències d'ADN procedents de diversos marcadors moleculars d'espècies haploides o espècies diploides que estiguin en *phase* (*Clustering with linked loci*).

6. Per altra banda, el *Poisson Tree Processes model* o PTP (Zhang *et al.* 2013), emprà arbres filogenètics no ultramètrics i basa l'anàlisi en el número de substitucions (considerant que el seu nombre és major entre espècies que dins una mateixa espècie). Recentment, se n'ha generat una nova versió, coneguda com bPTP, en la qual s'implementen valors bayesians a la probabilitat posterior de les espècies delimitades. El bPTP es va dur a terme al servidor *on-line* (<http://species.h-its.org/ptp/>), a partir d'un arbre generat per l'IQ-Tree (Nguyen *et al.* 2015). Sempre es comprova la convergència dels resultats obtinguts i que estiguin en equilibri.

Cal comentar que encara que ambdós programes (GMYC i PTP) solen coincidir en les espècies delimitades, el PTP sol obtenir uns resultats més consistents quan les distàncies evolutives entre les espècies són petites. Sobre les limitacions de cada uns d'ells podem comentar que el PTP té tendència a sobreestimar el nombre d'espècies quan a l'arbre filogenètic hi ha un desequilibri en el nombre d'individus emprats per espècie; i del GMYC, destacarem que pot presentar dificultats a l'hora d'analitzar mostres amb mides poblacionals grans i amb una taxa d'especiació ràpida.

3.2. GEN AGOUTÍ

Per a l'amplificació del gen *agoutí* es varen obtenir, de la base de dades GenBank, seqüències de diverses espècies per tal de dissenyar uns encebadors. La limitació d'informació sobre aquest gen en el moment de l'estudi va fer que les espècies emprades fossin: dues espècies de Titís, el *Leontopithecus rosalia* (EF094499) i el *Callimico goeldii* (EF094497), l'ovella (*Ovis aries*) (FJ889180), el moix (*Felis catus*) (AY237394), la rata (*Rattus norvegicus*) (AB045590) i el porc (*Sus scrofa*) (GQ373180). De l'alineació obtinguda, juntament amb l'anàlisi de la qualitat amb el programa *NetPrimer*, es van seleccionar els encebadors (**Taula 4**). Les mostres emprades per a l'estudi foren les indicades a la **Taula 5**.

Taula 4. Encebadors per a l'amplificació del gen *agoutí*.

| Fragment | Encebador | Seqüència 5'→3' |
|----------|-----------|----------------------|
| Exó 2 | ASIP2F | AGGATGGATGTCASCCGCCT |
| | ASIP2R | TYACCCACAATAGAGACAGA |
| Exó 3 | ASIP3F | GAAGCAYTGAACAAGAAATC |
| | ASIP3R | CCCAGTCCTACCTTRGAAGA |
| Exó 4 | ASIP4F | AARRAGGCTTCGAWGMAGAA |
| | ASIP4R | TCAGCAGTTGAGGTTGAGTA |



Taula 5. Mostres utilitzades per a l'estudi del gen *agouti*.

| Espècie | Població | Illa | Coloració |
|-----------------|-----------|----------|-------------|
| | Rei | Menorca | No melànica |
| <i>Podarcis</i> | Dragonera | Mallorca | No melànica |
| <i>lilfordi</i> | Moltona | Mallorca | Melànica |
| | Malgrat | Mallorca | Melànica |

Les condicions i els volums del reactius emprats per a l'amplificació foren els següents (a partir de l'article Li *et al.* (2010), amb petites modificacions). En un volum total de PCR de 25 µl:

- Aigua: 18,5 µl
- Tampó 10x: 2,5 µl
- dNTPs: 0,5 µl
- *Primer Forward/Reverse*: 1 µl/ 1 µl
- Taq polimerasa *DyNAzyme* (Thermo Fischer Scientific S.L., Massachusetts, EUA): 0,5 µl
- ADN: 1 µl 80 ng

Les condicions de la PCR:

- 94 °C 5 minuts
- 30 cicles de:
 - 94 °C 30 segons
 - 58 °C* 30 segons
 - 72 °C 30 segons
- 72 °C 8 minuts

*es varen realitzar diferents proves amb canvis de la temperatura *d'annealing* dins un rang de 53 °C a 62 °C.

La visualització de l'amplificació del producte de PCR es feia mitjançant gels d'agarosa al 2 %, tenyits amb bromur d'etidi. A totes les amplificacions es varen obtenir resultats negatius.

3.3. PROMOTOR DE L'*MC1R*

En començar les investigacions de l'amplificació del promotor del gen *MC1R* a la base de dades GenBank, no hi havia disponible cap seqüència d'aquesta regió d'aquest gen dins els rèptils, cosa que va fer necessària una recerca bibliogràfica per dissenyar uns primers adequats per a l'amplificació del promotor a les espècies *Podarcis pityusensis* i *Podarcis lilfordi*. Les mostres emprades per aquest estudi foren les següents (**Taula 6**).

Taula 6. Mostres analitzades.

| Coloració | Mostres | Població (Illa) | Espècie |
|---------------|---------|--------------------------|-----------------------|
| Melàniques | Ev1 | Escull vermell (Eivissa) | <i>P. pityusensis</i> |
| | A11 | Aire (Menorca) | |
| | Mo1 | Moltona (Mallorca) | <i>P. lilfordi</i> |
| | Gu1 | Na Guàrdia (Mallorca) | |
| | C3 | Es Colomer (Mallorca) | |
| No melàniques | E2 | Eivissa | <i>P. pityusensis</i> |
| | Co12 | Conillera (Cabrera) | |
| | Mp6 | Malgrat petit (Mallorca) | <i>P. lilfordi</i> |
| | Cf8 | Far de Cabrera | |
| | D22 | Dragonera (Mallorca) | |

De tota la informació obtinguda es va optar per treballar a partir de la informació aportada per Muhaghegh-Dolatabady i Habibizad (2014), en què s'analitzà la regió promotora de l'MC1R a l'espècie *Ovis aries*. Es va fer una alineació amb:

- La seqüència a partir de la qual obtenen els primers del promotor (Z31369.1)
- Una seqüència del promotor de l'MC1R que han amplificat (JF800648.1)
- Dues seqüències de l'MC1R de *Podarcis lilfordi* extretes de Buades *et al.* (2013): una de Cabrera (JX126623) i una de Dragonera (JX126628).

A partir de l'alineació anterior es van dissenyar un conjunt d'encebadors (Taula 7) amb els quals es preveia que s'obtindria un fragment d'uns 600-700 pb. La qualitat dels encebadors fou analitzada amb el programa *NetPrimer*.

Taula 7. Encebadors per a l'amplificació del promotor de l'MC1R.

| Encebador | Seqüència 5' → 3' | Referència |
|-----------|-------------------------|--|
| F Pmc1rMD | CTGCAGGTCCTTCTGGACTC | Muhaghegh-Dolatabady i Habibizad (2014) |
| R Pmc1r | TGCAGGTTCCGGTTTTTGACAAT | modificat de Buades <i>et al.</i> (2013) |

Les condicions i reactius per a l'amplificació foren els següents (Muhaghegh-Dolatabady i Habibizad 2014). En un volum total de PCR de 25 µl:

- Aigua: 19,875 µl
- Tampó 10x: 2,5 µl
- dNTPs: 0,625 µl
- Primer Forward/Reverse: 0,25 µl/ 0,25 µl
- Taq polimerasa *Dynazyme*: 0,5 µl
- ADN: 1 µl 80 ng



Les condicions de la PCR:

- 95 °C 5 minuts
- 30 cicles de:
 - 95 °C 45 segons
 - 63 °C* 30 segons
 - 72 °C 30 segons
- 72 °C 10 minuts

* Com que no es va obtenir amplificació, es va ampliar el rang de temperatura dels 40 °C fins als 62 °C, en intervals de 2 °C.

Com a conseqüència de no obtenir resultats, posteriorment es varen dissenyar nous encebadors, després de comprovar la seva qualitat al *NetPrimer*:

- F1 Pmc1r: 5'- CTGCNNGGTCCTTCTNGANTC -3'
- F2 Pmc1r: 5'- TACCTGTCTGCCTCTCTTGA -3'
- F3 Pmc1r: 5'- CAGGAGACTGGAGAGGTTC -3'
- R1 Pmc1r: 5'- GGTTCCGGTTTTTGACAATGG -3'

En base a la temperatura de *melting* (T_m) dels encebadors es van repetir les amplificacions a diverses temperatures *d'annealing*: 55 °C, 58 °C i 63 °C, amb les combinacions d'encebadors següents: i) *Primer F i R1*, ii) *Primer F1 i R*, iii) *Primer F1 i R1*, iv) *Primer F2 i R*, v) *Primer F2 i R1*, vi) *Primer F3 i R i* vii) *Primer F3 i R1*.

Es va analitzar el producte de les PCRs anteriors, amb gels d'agarosa a l'1 % tenyits amb bromur d'etidi.

Amb la combinació d'encebadors F3 i R, es va observar un lleuger *smear* a les mostres Ev1 i A11. Per aquesta raó es va repetir la mateixa PCR ampliant el rang de la T_a *d'annealing* (amb un increment de 2 °C): 47-57 °C. A continuació, es visualitzaren els resultats en gels a l'1 % d'agarosa. Es van purificar les mostres: Ev1 a 55 °C, i A11 a 55 °C i 49 °C. El *kit* emprat fou el MSB® Spin PCRapace (Invitak GmbH, Berlin, Alemanya). Posteriorment, es van quantificar amb el NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Chicago, EUA), i totes presentaven una puresa de l'1,975.

3.4. ESTUDI D'EXPRESSIÓ GÈNICA (ARNm)

3.4.1 Gen MC1R

3.4.1.1. Mostres

Es varen obtenir mostres de 21 individus de 3 poblacions de *Podarcis lilfordi* provinents de les illes de l'Aire (melànica), Rei (no melànica) i Moltona (melànica) i d'una població de l'espècie *Podarcis pityusensis* de Formentera localitzada a Punta Trocadors (no melànica). Totes les mostres per a aquest estudi foren recollides entre l'agost i el novembre del 2015. Addicionalment, i amb la finalitat de posar a punt la metodologia d'extracció, 3 mostres de l'espècie *P. lilfordi* procedents d'individus estabulats a la UIB, foren cedides pel Dr. Andreu Rotger. Totes les mostres eren melàniques i procedents de l'illa Moltona (Mallorca) (**Taula 8 i Figura 45**).

Taula 8. Mostres emprades per a l'anàlisi de l'expressió de l'MC1R.

| Espècie | Població | Illa | N |
|-----------------------------|-----------------|------------|---|
| <i>Podarcis pityusensis</i> | Punta Trocadors | Formentera | 3 |
| | Rei | Menorca | 7 |
| <i>Podarcis lilfordi</i> | Aire | Menorca | 4 |
| | Moltona | Mallorca | 7 |

Per tal de preservar la qualitat i la integritat de l'ARN, les diferents passes del maneig del teixit han de ser controlades acuradament per evitar al màxim la degradació per l'acció de les RNAses (Pérez-Novo *et al.* 2005). Cal destacar que hi ha mostres que havien de venir d'altres illes per correu i algunes d'elles durant el mes d'agost amb altes temperatures. Es va optar per la utilització de vials de 5 ml de *RNAlater*TM (Qiagen), ja que els reactius presents en aquest *kit* penetren en el teixit i permeten establir totes les molècules d'ARN i evitar la seva degradació durant l'extracció del teixit animal, la seva manipulació i el posterior trasllat al laboratori de la Universitat. A més, el *RNAlater*TM, ens dóna l'opció de conservar les mostres a un congelador de -20 °C i el teixit es pot descongelar i tornar a congelar, fet que facilita el seu manteniment i ús al laboratori.

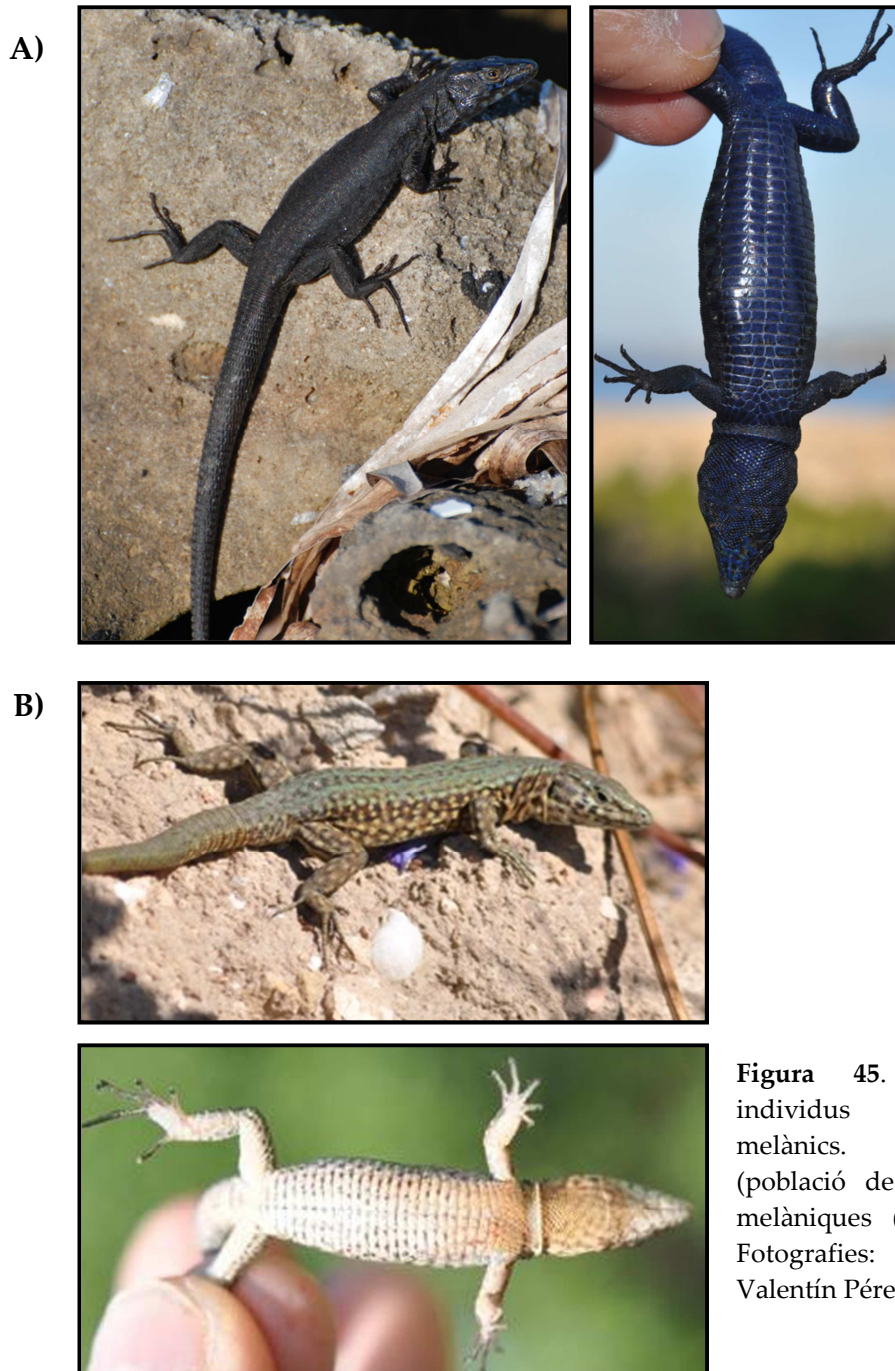


Figura 45. Coloració dels individus melànics i no melànics. a) Melànics (població de Moltona), b) No melànics (població de Rei). Fotografies: Bàrbara Terrasa i Valentín Pérez Mellado.

A l'hora de posar el teixit en els vials s'ha de tenir en compte la quantitat de teixit que es posa al tub per tal que el *RNA later* protegeixi tot el teixit; la proporció ha de ser de 10x (10 μ l de *RNA later* per mg de teixit). Com a màxim, es poden posar 0,5 g de teixit (**Figura 46**). Quan s'obtenia la mostra directament al camp s'havia de fer de forma orientativa, i es va seguir el criteri d'intentar posar un màxim de 0,4 g (aproximadament entre 12 i 18 discs, tenint en compte la variació en funció del diàmetre de les coes i d'una amplada de tall de 0,5 cm). Tot el procés es va procurar fer amb la màxima rapidesa.



Figura 46. Vials de *RNA later*.

La temperatura va ser un factor important a considerar donat que segons el manual del fabricant, les molècules es mantenen en bones condicions durant 24 h a 37 °C, durant 7 dies a una temperatura compresa entre 18-25 °C i 4 setmanes entre 2-8 °C. Per això, era molt important mantenir al màxim unes baixes temperatures mitjançant geleres portàtils. Per conservar totes les mostres de forma definitiva es va fer a -20 °C, sempre amb un pas previ d'incubació tota la nit a 2-8 °C.



3.4.1.2. Extracció ARN

Prèviament a l'inici de les extraccions al laboratori es va destinar una zona exclusiva i descontaminada per treballar amb ARN, per evitar qualsevol tipus de contaminació creuada amb ADN i/o contaminació de la zona de treball amb RNAses.

La descontaminació del material es va fer seguint les passes indicades a continuació (Ishikawa 1977):

- a) Es va netejar el material amb SDS a l'1 % i posteriorment es va passar amb aigua milliQ.
- b) Després es va passar tot el material amb etanol al 100 %.
- c) El material es va cobrir totalment amb una dissolució de peròxid d'hidrogen (H₂O₂) al 3 % durant un mínim de 10 minuts.
- d) Per finalitzar, tot el material es va passar amb aigua DEPC; i una vegada eixut ja es va poder utilitzar.

L'extracció de l'ARN de les mostres es va fer mitjançant el *RNeasy Midi kit* (Qiagen), que es caracteritza per treballar amb tubs de 15 ml i amb extraccions de teixit amb un rang d'entre 130-250 mg (amb un volum d'ARN extret de 150 µg-1 mg en 250 µl de volum eluït).

Aquest *kit* permet obtenir molècules d'ARN majors a 200 nucleòtids. Gràcies a aquesta selecció en funció de la longitud, s'obté una major mostra d'ARNm, i s'eliminen els ARN inferiors a 200 nucleòtids com l'ARNr 5,8S, l'ARNr 5S i ARNt, que representen entre un 15 i un 20 % de l'ARN total (Manual RNeasy Midi/Maxi 09/2010).

Amb la finalitat que els resultats fossin comparables era necessari partir del mateix volum de mostra (Huggett *et al.* 2005), i aquesta fou, a més, fragmentada en bocins el més petits possible, per facilitar el procés d'homogeneïtzació i ruptura de la mostra. La protecció que dona el *RNAlater* ens va permetre realitzar aquests processos a temperatura ambient.



El protocol a seguir per a l'extracció d'ARN fou el següent:

1. Als 0,15 g de mostra pesats, es van afegir 4 ml del tampó RLT (reactiu que intervé en el trencament i homogeneïtzació del teixit). Al tampó prèviament se li va afegir 40 μ l de β -mercaptoetanol, agent reductor que desnaturalitza les RNAses mitjançant ponts disulfits i destruint la seva estructura, essencial per a la correcta funcionalitat de l'enzim). Després es va homogeneïtzar amb l'aparell Ultra-turrax T8 (Ika-Werke). Es feien entre 3-5 tandes de 15 segons a una potència d'entre 6-8 (essent 8 la màxima potència de l'aparell), s'intercalaven tandes de 15 segons de descans per evitar que l'aparell s'escalfés. El nombre de tandes va dependre de la mida inicial dels fragments.
2. Després es van afegir 65 μ l de proteïnasa K i es van posar les mostres al bany durant 20 minuts a 55 °C.
3. Es van centrifugar les mostres durant 10 minuts a 4000 g a 22 °C (centrífuga refrigerada Sigma 2 16K).
4. A continuació, es va recollir el sobrenedant i es va posar a un tub nou de 15 ml. Després de la centrifugació se sol formar un precipitat i una capa molt fina per sobre el sobrenedant. Cal intentar no agafar qualsevol de les dues coses anteriors ja que interfereixen negativament en la qualitat del l'extracció. És important anotar el volum de sobrenedant recollit a cada mostra.
5. Posteriorment, es va afegir 0,5 V d'etanol absolut en funció del sobrenedant recollit a l'anterior pas. Per acabar, es va agitar invertint o pipetejant, en cap cas es pot centrifugar.
6. En la següent pas es van recollir 4 ml, com a màxim, de la mescla anterior i es va dipositar al tub amb columna proporcionat pel *kit*.
7. Durant 5 minuts es va centrifugar i es va descartar el *flow-through* (o FT). El FT corresponia a la fase líquida que passa a través del filtre.
8. Es va realitzar una digestió amb DNasa (RNase-free DNase, Qiagen)
 - a. S'afegiren 2 ml del tampó RW1 (té la funció de netejar la columna) i es va centrifugar durant 5 minuts. L'FT es va descartar.
 - b. Es va preparar una mescla amb: 20 μ l de DNasa dins 140 μ l del tampó RDD per cada mostra. El tampó ajuda a la digestió de l'ADN i garanteix que l'ARN es mantingui unit a la membrana de la columna. Es va deixar actuar durant 15 minuts a temperatura ambient.
 - c. Es van afegir 2 ml del tampó RW1 i es va deixar reposar 5 minuts.
 - d. Per acabar, es va centrifugar durant 5 minuts i es va descartar el FT.
9. Després es va afegir 2,5 ml del tampó RPE (s'empra per netejar la columna) i es va centrifugar 2 minuts. Es va descartar el FT.
10. Posteriorment, es va afegir 2,5 ml del tampó RPE i es va centrifugar 5 minuts. El FT es va descartar.
11. El filtre es va posar a un tub nou de 15 ml i s'hi afegí 250 μ l d'aigua DEPC (volum segons el *kit*) i es va deixar actuar durant 1 minut.
12. Per eluir l'ARN de la membrana es va centrifugar durant 3 minuts.
13. Finalment, es van repetir els passos anteriors, 11 i 12, utilitzant els 250 μ l eluïts, així concentrarem més la mostra.

Una vegada extret l'ARN de les mostres es va conservar sempre a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per evitar qualsevol tipus de degradació.

3.4.1.3. Quantificació i anàlisi de qualitat

Per a la quantificació de l'ARN, es va emprar l'aparell NanoVue Plus™ (GE healthcare). Per a cada una de les mostres s'utilitzava un volum de $2\text{ }\mu\text{l}$. L'aparell d'espectrofotometria, també ens aporta la puresa de cada mostra (Fleige i Pfaffl 2006).

Per poder analitzar la qualitat de l'ARN extret, també es realitzaren gels d'agarosa a l'1 % amb TAE a l'1 % tenyits amb bromur d'etidi. Per a una correcta visualització es van preparar 100 ng de cada mostra i amb el corresponent volum de tampó de càrrega (la proporció era d'1 μl de tampó per cada 4 μl d'ARN). Abans de preparar la mescla anterior, l'ARN es va posar 10 minuts a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ al termoblock i, posteriorment, es va refredar 3 minuts en gel per desnaturalitzar l'ARN (segons els protocols de Thermo Fischer).

La visualització dels gels es feia a través de l'aparell MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems). Com a marcador es va utilitzar l'*hyperladder* d'1 kb (Bioline), el qual parteix d'una banda de 200 pb fins arribar a les 10.037 pb. Una mostra d'ARN de bona qualitat necessària per a les posteriors anàlisis d'expressió hauria de presentar dues bandes majoritàries, les quals corresponen als dos ARN més abundants: 28S i 18S. En el nostre cas, tenien uns 1.300 pb i de 700 pb, respectivament. Segons Sambrook i Russell (2001), els ARNm obtinguts són d'una qualitat excepcional quan la proporció del 28S és el doble del 18S. En qualsevol cas no s'hauria d'observar *smear*, ni tampoc una banda molt gran, situada a la part superior del gel, que indica contaminació d'ADN (Ishikawa 1977). Aquesta es pot observar a la **Figura 47**.

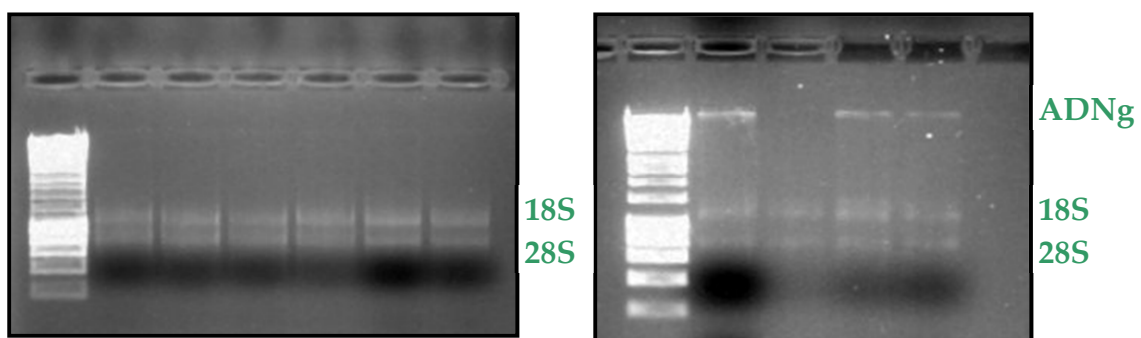


Figura 47. Gels d'agarosa on es pot observar l'absència (esquerra) i la presència (dreta) de contaminació d'ADN genòmic.



3.4.1.4. Digestió ADN

La utilització de DNases en el procés d'extracció no va ser suficient per eliminar la contaminació genòmica, inclús quan no s'apreciava banda als gels d'agarosa, es detectava contaminació a la PCR quantitativa (qPCR).

Habitualment per eliminar completament l'amplificació de l'ADN genòmic a la qPCR es dissenyen els *primers* flanquejant els introns, de tal manera que l'ADN genòmic amplificat és un fragment molt més llarg que l'ARN, ja que sols correspon a la regió codificant (**Figura 48**). Però en el nostre cas el gen *MC1R*, no conté cap intró, i aquest pas limitant és impossible de dur a terme, per tant, i amb la finalitat d'evitar que l'ADN interferís en les anàlisis posteriors es va afegir una passa intermèdia de digestió d'ADN, prèvia a la retrotranscripció.

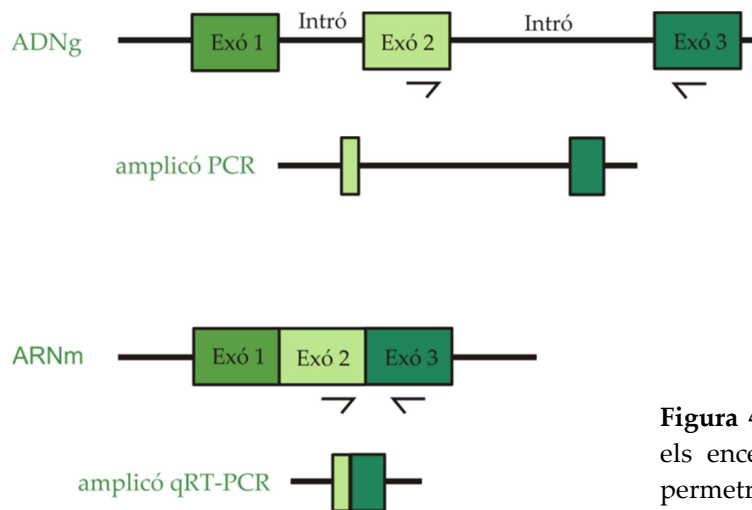


Figura 48. Esquema per dissenyar els encebadors per la qPCR que permetrien evitar l'amplificació d'ADN genòmic.

A fi de minimitzar errors experimentals i assegurar un volum de la mostra similar (Huggett *et al.* 2005), es feia servir la mateixa quantitat d'ARN en totes les mostres, 100 ng. A més, de cada tanda d'extracció se seleccionava una mostra de forma aleatòria, de la qual, es feia un duplicat que serveix de control de contaminació d'ADN.

Per a la digestió d'ADN es va utilitzar la DNase I *amplification grade* (Sigma Aldrich) i el procediment fou el següent:

1. Es van preparar tubs de PCR:
 - a. 100 ng d'ARN en 8 μ l d'aigua
 - b. Es va afegir 1 μ l de tampó 10x
 - c. Es va afegir 1 μ l de DNase I *amplification grade* 1 unit/ μ l



2. De forma suau es va mesclar, mai vortejar (la DNase I és molt sensible i es desnaturalitza molt fàcilment amb forces físiques) i es va incubar la mescla durant 15 minuts a temperatura ambient.
3. Es va afegir 1 µl de la solució STOP (dissolució d'EDTA a 50mM, la qual inactiva la DNase I, unint-se als ions de calci i magnesi).
4. Posteriorment, es va incubar la mostra a 70 °C durant 10 min., d'aquesta manera es desnaturalitzen tant les cadenes de la DNase I com l'ARN.
5. A continuació, es van deixar les mostres en gel.
6. Finalment, seguint les indicacions del manual de la DNase I, les mostres ja estaven preparades per realitzar directament el següent pas de retrotranscripció.

3.4.1.5. Retrotranscripció (pas d'ARN a ADNc)

Per a la realització d'aquest pas es va emprar el *kit All-in-one cDNA Synthesis SuperMix* (Biotool). Les mostres estaven compostes per tots els ARN superiors a 200 pb, segons el *kit* d'extracció *RNAeasy midi kit*, però per a l'anàlisi d'expressió gènica sols es quantifiquen els ARNm. *All-in-one cDNA Synthesis SuperMix*, va permetre aquesta selecció gràcies a la utilització de: *All-in-one oligos* (dT) i '*random primers*'.

Reactius per a cada mostra:

1. ARN total/ARNm (entre 5-500 ng)
2. 2 µl de 5x qRT SuperMix*
3. Aigua sense ARN fins a 10 µl

* En el cas de la mostra control es van afegir 2 µl de la 5x No RT Control Mix. Per la qual cosa que qualsevol amplificació d'aquesta mostra en la qPCR, indicaria presència de contaminació genòmica.

Protocol de retrotranscripció realitzat al termociclador *SimpliAmp* (Applied Biosystems-Life Technologies):

1. 10 minuts a 25 °C
2. 30 minuts a 42 °C
3. 5 minuts a 85 °C

Una vegada finalitzat el procés, les mostres es van conservar a -20 °C.



3.4.1.6. Anàlisi d'expressió gènica

La PCR quantitativa en temps real (qRT-PCR) va ser el mètode utilitzat per quantificar l'expressió gènica. Aquesta tècnica és la més adequada ja que és la més sensible i fiable, sobretot per gens amb poca expressió, ARN degradat i amb mostra de teixit limitant (Pfaffl 2006). Es va realitzar l'anàlisi d'expressió a l'aparell LightCycler 480 (Roche).

Per a l'estudi s'emprà la β -actina (*ACTB*) com a gen de referència (o *housekeeping gene*), el qual serveix com a control intern ja que s'expressa de forma constitutiva.

Els primers utilitzats foren els següents (Fulgione *et al.* 2015):

MC1R:

Forward: 5'- TGGAGACCCTCTTCATGCTTCT-3'

Reverse: 5'- GCTGCAGATCAGCATGTCCA-3'

ACTB:

Forward: 5'- GATCTGGCACCCACSCCTTCT-3'

Reverse: 5'- TCTTTTCTCTGTTGGCTTTGG-3'

Les condicions i les diferents fases del termociclador utilitzades foren les indicades a continuació (Fulgione *et al.* 2015 i Manual SYBR® Premix Ex Taq™ II de TAKARA):

a) *Mix* per la PCR (volum final de 20 μ l):

- Aigua 6,4 μ l
- SYBR® Premix Ex Taq™ II 2x 10 μ l
- *Primer Forward* (10 μ M) 0,8 μ l
- *Primer Reverse* (10 μ M) 0,8 μ l
- ADN* 2 μ l

* si la mostra motlle (*template*) és ADNc es recomana emprar quantitats inferiors a 100 ng i, no hauria de representar més d'un 10 % del volum final de la PCR.

b) Condicions al termociclador:

1. Preincubació: 95 °C 30 segons
2. Amplificació (x 45 cicles):
 - d. 95 °C 15 segons
 - e. 60 °C 30 segons
 - f. 72 °C 20 segons
3. Corba de fusió o *melting*¹:
 - g. 95 °C 5 segons
 - h. 65 °C 1 minut
 - i. 97 °C de forma contínua
4. Refredament: 40 °C 30 segons

¹ Les corbes de fusió o *melting curves* permeten saber si s'ha generat un sol producte de PCR o pel contrari n'hi ha hagut més. Els fluorocrom utilitzat, el SYBR Green, s'uneix i emet fluorescència quan està unit a la doble cadena d'ADN. En canvi no emet

fluorescència en estar lliure o unit a una cadena simple d'ADN. Per això, al final de l'amplificació es realitza el pas 3, on a mesura que s'incrementa la Ta, les cadenes d'ADN es van separant i la fluorescència va disminuint progressivament. La Ta de fusió o *melting* de qualsevol producte de PCR és característic (depèn de la longitud, de la proporció GC, entre d'altres). A la **Figura 49**, es pot observar com es va obtenir un sol pic, que indicaria un producte de PCR específic.

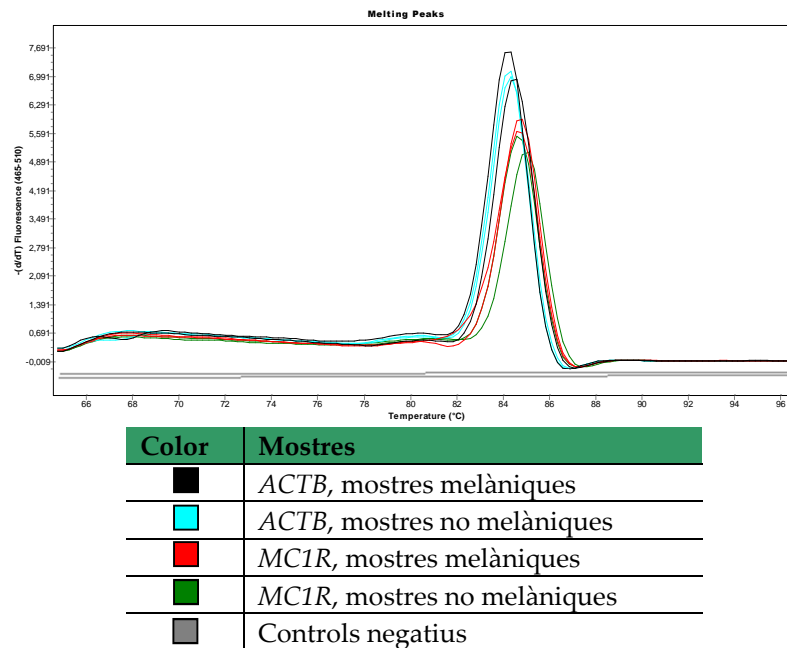


Figura 49. Corbes de fusió obtingudes.

Càlculs de l'expressió relativa del gen

La quantificació relativa es basa en la comparació de l'expressió del gen d'estudi a les mostres analitzades en funció de l'expressió d'aquest gen a una mostra control o calibradora. I tots els valors d'expressió del gen d'estudi es normalitzen en funció del gen de referència, el qual serveix com a control intern (Pfaffl 2006). Analitzarem individus melànics enfront d'individus no melànics procedents de diferents poblacions per intentar observar si hi havia diferenciació d'expressió al gen d'estudi (o *target gene*) MC1R. La mostra calibradora elegida fou la Ft4, individu no melànic de l'espècie *P. pityusensis*. Es realitzaren 2 rèpliques per a cada una de les mostres.

Els càlculs es van basar en la comparació dels valors Cp (*crossing point* o punt de creuament) o Ct (*threshold value* o valor umbral) a un nivell constant de fluorescència (Pfaffl *et al.* 2004). Aquests valors van indicar el número de cicle a partir del qual la fluorescència generada superava el llindar de detecció de la fluorescència i eren inversament proporcionals al nivell d'expressió original del gen d'interès (*Qiagen resources*).



Els resultats obtinguts pel LightCycler480 foren exportats a un document *Microsoft excel*, per calcular, posteriorment, les diferències d'expressió gènica. Per realitzar els càlculs es van aplicar els següents models matemàtics:

a) $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak i Schmittgen 2001), on

$$\Delta\Delta CT = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{referència}})_{\text{Time X}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{referència}})_{\text{Time 0}}$$

en el nostre cas, es van considerar les mostres no melàniques com a *Time 0* i les mostres melàniques com el *Time X*. Els resultats de l'expressió gènica es van presentar en *fold change* (FC). Els valors obtinguts es varen normalitzar en funció del gen de referència (en el nostre cas la *ACTB*), i relatiu a una mostra control o calibradora.

b) Relació (*ratio*) d'expressió relativa (Pfaffl 2001), on, a diferència de la fórmula anterior es tenen en compte les eficiències de les PCR del gen d'estudi i el de referència. I la seva equació correspon a:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Per calcular l'eficiència de les qRT-PCR es va realitzar una recta patró per a cada un dels gens analitzats: *ACTB* (gen de referència o *reference gene*) i *MC1R* (gen d'estudi o *target gene*). L'eficiència varia en funció del procediment seguit a cada laboratori degut a l'ús específic de cada aparell, reactius, *primers*, etc. Es va emprar la mostra R5, individu no melànic de la població de Rei, *P. lilfordi*. La recta patró es va basar en 6 dilucions i 4 rèpliques de cada una d'elles.

Una vegada obtinguts els resultats es va analitzar si seguien una distribució normal amb el test de Shapiro-Wilk (indicat per un mida mostral <30). La variable amb una distribució normal (la *ACTB*) es va analitzar amb la *t* Student dels grups melànics i no melànics. Mentre que la variable quantitativa que no seguia una distribució normal (*MC1R*), per això es va analitzar emprant proves no paramètriques, Mann-Whitney. Els càlculs estadístics es van realitzar utilitzant el paquet estadístic SPSS (SPSS v11.0, SPSS Inc., Chicago).

3.4.2 Gen *agouti*

Amb la finalitat de conèixer la seqüència del gen *agouti*, es va obtenir una alineació amb les següents mostres de la base de dades GenBank:

- Una seqüència de l'ARNm de l'espècie *Gekko japonicus* (XM015413402).



- Una seqüència de l'ARNm de l'espècie *Anolis carolinensis* (XM008110003).

Una vegada feta l'anàlisi i la revisió amb el *NetPrimer*, es van dissenyar els següents encebadors (fragment amplificat de 80 pb aprox.; cal remarcar que la longitud recomanada per amplicons de qPCR és d'entre 50-150 pb):

Forward ASIPrnaF: 5'- GAAGWTAAGYAGGAAAGARG -3'

Forward ASIPrnaF1: 5'- GAAGWTAAGYAGGAAAGARGC -3'

Reverse ASIPrnaR: 5'- GCCCARGTAGSCACACAG -3'

Per a un volum de 25 µl de PCR, els reactius per a l'amplificació foren els següents (reactius de la casa *Bioline*):

- Aigua: 18,2 µl
- Tampó 10x: 2,5 µl
- MgCl₂: 1,75 µl
- dNTPs: 1 µl
- *Primer Forward/Reverse*: 0,25 µl/ 0,25 µl
- Taq polimerasa: 0,05 µl
- ADN: 1 µl 20 ng

Les condicions de la PCR:

- 94 °C 4 minuts
- 35 cicles de:
 - 94 °C 30 segons
 - gradient* 30 segons
 - 72 °C 1 minut
- 72 °C 5 minuts

* Gradient es refereix a què es van fer amplificacions de les mateixes mostres amb un rang ampli de temperatures:

- Pels encebadors F i R de 46-56 °C
- Pels encebadors F1 i R de 48-58 °C.

Les mostres emprades per aquest estudi foren dos individus de cada una de les poblacions indicades a la **Taula 9**.

Taula 9. Poblacions emprades per a l'amplificació de l'*agoutí*.

| Espècie | Població | Illa |
|-----------------------------|-----------------|------------|
| <i>Podarcis pityusensis</i> | Punta Trocadors | Formentera |
| | Rei | Menorca |
| <i>Podarcis lilfordi</i> | Aire | Menorca |
| | Moltona | Mallorca |

Es va dur a terme la comprovació de l'amplificació en gels d'agarosa a l'1 % i al 2 %, tenyits amb bromur d'etidi. A cap dels gels es va obtenir una única banda, específica pel gen *agoutí*, amb la qual cosa no es va realitzar la qPCR.



3.4.3 Exoma-ARNseq

Per detectar l'existència d'expressió diferencial entre individus melànics i no melànics a l'espècie *P. lilfordi* es varen capturar 3 individus de l'illa de Moltona (amb un fenotip melànic) i 3 individus de Dragonera (amb fenotip no melànic). Per tal de disposar de mostres amb una bona qualitat es van recollir amb un permís de la Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori, Govern de les Illes Balears (permís CEP 56/2013). L'empresa Lifesequencing de València va ser l'encarregada de realitzar la seqüenciació massiva.

3.4.3.1. Extracció i obtenció dels pools

Es van emprar 250 mg del teixit de la coa de cada un dels 6 individus i el *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen) per a l'obtenció de l'ARN. Una vegada extret l'ARN es va analitzar la seva puresa i integritat amb el Bioanalitzador EXPERION (BIO-RAD). Cal comentar que totes les mostres eren d'una bona qualitat ja que mostraven un valor de RIN (*RNA Integrity Number*) superior a 8 i una puresa adequada.

Prèviament al pas de realització dels pools, les mostres d'ARN foren netejades emprant *kit RNA Mini spin clean up* (Qiagen). Posteriorment, es van realitzar dos pools, un per a cada un dels fenotips (melànic i no melànic), els quals contenien els ARN dels 3 individus de cada tipus.

3.4.3.2. Obtenció de les llibreries d'ARN i seqüenciació

Es va construir una llibreria mitjançant el seqüenciador Ion Torrent per a cada un dels pools a partir del *kit Ion total RNA-Seq v2*, seguint l'informe *Ion Total RNA-Seq Kit v2 User Bulletin* (més concretament s'emprà l'apartat: *Preparing 300-base-read RNA libraries for sequencing on the Ion PGM™ System*). Abans de l'amplificació clonal ambdues llibreries es van quantificar amb el Bioanalitzador Agilent 2100 (Agilent Technologies Inc, Palo Alto, California). Després es realitzà l'emulsió PCR (emPCR) amb el *kit Ion PGM Template OT2 400* seguint les condicions del fabricant.

La seqüenciació de les llibreries es va realitzar a Lifesequencing SL (Lifesequencing, Valencia, Spain) amb el xip Ion 318 v2 al *Personal Genome Machine* (PGM (IonTorrent™, Lifetechnologies) emprant el *kit Ion PGM Sequencing 400* seguint el protocol que corresponia (Publicació número MAN0007242, Revisió 2.0, Lifetechnologies).

3.4.3.3. Bioinformàtica

Control de qualitat de les lectures

Les lectures es van netejar amb el programa Cutadapt v 1.3 (Martin 2011), que elimina els adaptadors de la seqüenciació. Durant aquest procés (conegut com *trimming*) es descarten les lectures no informatives (*empty reads*) i les seqüències amb baixa qualitat ($Q < 20$). Posteriorment, les seqüències es visualitzen amb el programa FASTQC versió 0.10.1.



Transcriptoma de referència

Es va intentar emprar com a genoma de referència el d'*Anolis carolinensis* (AAWZ00000000), però malauradament no es van trobar regions comunes. Per tant, les lectures d'ambdues llibreries es van unir i assemblar emprant l'Abyss v. 1.3.6. per tal de formar el transcriptoma de referència. Els transcrits foren anotats emprant el programa BLAST2GO v 2.8. (Conesa *et al.* 2005).

Anàlisi de l'expressió diferencial

Cada lectura es va alinear amb el transcriptoma de referència emprant el programa TopHat v 2.0., seguint les condicions estàndard (Kim *et al.* 2013). Les diferències d'expressió entre el grup del fenotip melànic i el no melànic es va fer a partir del programa limma (pertanyent al paquet Bioconductor R). I finalment, el programa BLAST2GO v 2.8. (Conesa *et al.* 2005) es va utilitzar per etiquetar la funció de tots els grups de gens importants amb diferències d'expressió.

4. RESULTATS

CAPÍTOL 1

GENÈTICA DEL MELANISME A LES *PODARCIS* BALEARS

Variability of the *MC1R* gene in melanic and non-melanic *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis* from the Balearic Archipelago

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

PLoS One (2013) 8(1): e53088

PLoS One (2013) 8(9): 10.1371/annotation/203b494a-8670-4b4a-8f4f-a101cf03dcc8

Melanism in insular lizards: No differential *MC1R* gene expression but differences in metabolic rate and inflammatory response detected by transcriptome analysis

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

**Comparative Biochemistry and Physiology Part B:
Biochemistry and Molecular Biology
(enviat)**



En aquest capítol es reuneixen dos treballs relacionats amb el gen *MC1R*. S'estudia aquest gen en base a un destacat nombre de publicacions que el relacionen amb la presència d'individus melànics a diferents espècies. Les espècies d'interès en ambdós estudis són 2 espècies del gènere *Podarcis* presents a les Illes Balears: *Podarcis lilfordi* i *P. pityusensis*, les quals tenen diverses poblacions melàniques i les no melàniques presenten una gran variabilitat de coloracions.

En la primera investigació es va posar a punt l'amplificació de la major part del gen *MC1R* (720 pb), obtenint-ne la seqüència d'un total de 73 individus de diverses poblacions de les dues espècies abans esmentades. Per a l'estudi també es van emprar mostres d'altres espècies de *Podarcis*: *P. tiliguerta* (3) i *P. filfolensis* (1). A més a més, s'analitzen totes les mutacions observades per tal d'identificar si alguna d'aquestes està relacionada amb la presència d'individus melànics.

En altres publicacions es van trobar evidències de que canvis en l'expressió podien ser els responsables de determinades pigmentacions com el melanisme. Per això, es van recollir 21 noves mostres de poblacions amb individus melànics junt a altres poblacions no melàniques, analitzant-se de totes elles els possibles canvis en els nivells de l'ARN transcrit del gen *MC1R*.

Es va analitzar el conjunt de tot l'exoma, a través del transcriptoma i a partir de tres individus procedents de Moltona (melànics) i d'altres tres de sa Dragonera (no melànics) per a poder conèixer si hi havia canvis d'expressió i/o rutes metabòliques alterades que donessin suport a la condició melànica.

Variability of the *MC1R* gene in melanic and non-melanic *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis* from the Balearic Archipelago

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

Abstract

The association between polymorphism at the *MC1R* locus and colour variation was studied in two wall lizard species (*Podarcis lilfordi* and *P. pityusensis*) from the Balearic archipelago. *Podarcis lilfordi* comprises several deep mitochondrial lineages, the oldest of which originated in the Pliocene, while much shallower mitochondrial lineages are found in *P. pityusensis*. Here, we examined whether specific substitutions were associated with the melanic colouration found in islet populations of these species. Homologous nuclear sequences covering most of the *MC1R* gene were obtained from 73 individuals from *Podarcis* populations, which were assigned to melanic and non-melanic groups (the entire gene was also sequenced in six selected individuals). MtDNA sequences were also obtained from these specimens to allow comparison. *MC1R* showed greater polymorphism in *P. lilfordi* than in *P. pityusensis*. However, we observed no substitutions that were common to all melanic individuals across the two species. The only significant association was detected in the 681nt of *MC1R* sequence gene, but this was a synonymous A/G mutation with A alleles being more abundant in melanic populations. In addition, there were no associations between the main dominant phenotypes (green and brown, blue and yellow spots and ventral colour) and synonymous or non-synonymous substitutions in the *MC1R* gene. There was no statistical evidence of selection on *MC1R*. This study suggests no relationship between *MC1R* polymorphism and colour variation in Balearic *Podarcis*.

Key words: Balearic Islands, colour pattern, evolution, *MC1R* gene, melanism, *Podarcis*.

Short running head: The *MC1R* gene and melanism in Balearic *Podarcis*.



Introduction

Although environmental stimuli can contribute to colour variation within species, most of this variation appears, to be genetically controlled (Hubbard *et al.* 2010). Molecular analyses are starting to reveal mutations associated with melanism in wild populations. In some birds and mammals, melanism seems to be associated with amino acid substitutions in the melanocortin-1 receptor (*MC1R*, a gene known to control the synthesis of melanin by melanocytes (Robbins *et al.* 1993; Takeuchi *et al.* 1996). The agouti-melanocortin 1 receptor pathway is a ligand receptor pair that modulates the amount and type of pigment -red/yellow pheomelanin or brown/black eumelanin- produced by melanocytes. Genetic subtypes of *mcr* genes (of which *MC1R* is one) have high structural similarity. The majority of them seem to have originated before the divergence of ray-finned fishes and tetrapods, early in vertebrate evolution (Schioth *et al.* 2005). The main structural properties of these genes have remained remarkably conserved over a period of at least 400 million years (Schioth *et al.* 2005). Gain-of function and/or deletion mutations in the *MC1R* locus are well recognized causes of melanism (Anderson *et al.* 2009). For example, a deletion in the *MC1R* gene explains melanism in squirrels (McRobie *et al.* 2009). In birds, Guo *et al.* (2010) reported abundant polymorphism in the *MC1R* gene which was associated with black plumage in chicken. Different mutations in the *MC1R* gene also explain the brown phenotype in the cavefish, *Astyanax mexicanus* (Gross *et al.* 2009).

Recently, several studies have addressed the *MC1R* gene and colour polymorphism in amphibians and reptiles. Three independent *MC1R* mutations (His²⁰⁸Tyr, Thr¹⁷⁰Ile, and Val¹⁶⁸Ile) are responsible for blached coloration of lizards on the gypsum dunes of White Sands, New Mexico. They are associated with melanin production in the species *Holbrookia maculata*, *Aspidoscelis inornata* and *Sceloporus undulates* (Rosenblum *et al.* 2010). Although the same gene contributes to light phenotypes in these White Sands populations, the specific molecular mechanisms leading to reduced melanism production appear to be different. In contrast, sequence variation in *MC1R* does not explain melanism in the widespread amphibian *Rana temporaria* (Herczeg *et al.* 2010) nor does it appear to be involved in dorsal colour adaptations in two sympatric species of sand lizards (*Liolaemus*) that inhabit the south eastern coast of South America (Corso *et al.* 2012) or colour pattern in the Uta lizards (Micheletti *et al.* 2012). Some authors consider blue colouration to be a form of melanism in reptiles (Raia *et al.* 2010). However the blue abdominal skin seen in several lizards is a sexually dimorphic trait that is more pronounced in males (Bagnara *et al.* 2007) and is attributed to eliciting a behavioural response in the observer (Parker 1998). Recently, an association between *MC1R* variants and colour phenotypes, described as prevalence of brown scales, in the European ocellated lizard, *Lacerta lepida* (*Timon lepidus*) has been described (Nunes *et al.* 2011).

The genus *Podarcis* is one of the most diverse and abundant reptile groups in southern Europe, with more than 20 currently recognized species (Harris i Arnold 1999; Arnold *et al.* 2007). Eisentraut (1954) appears to have been the first researcher to describe insular melanism in Mediterranean *Podarcis* from Capri Island. Melanic

lizards and darker individuals in general, were thought to be associated with older island populations (Kramer 1949; Eisentraut 1949, 1954).

Two endemic species of *Podarcis* inhabit the Balearic Archipelago: *Podarcis lilfordi* in the Eastern Gymnesic Islands group (Mallorca, Menorca, Cabrera and their coastal islets) and *Podarcis pityusensis* in the Western Pityusic group (Ibiza, Formentera and coastal islets). Phylogenetic analyses have showed geographical structuring of mtDNA among insular populations of *P. lilfordi* with four main intraspecific lineages, the first of which diverged some 2.6 Ma (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009). Divergence within *P. pityusensis* is more recent with the main Ibiza and Formentera clades sharing a common ancestor around 1 Ma ago (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009).

Eisentraut (1949) described melanic populations of *P. lilfordi* from the islands of Aire (Menorca), and Foradada (Cabrera archipelago), as well as in *Podarcis pityusensis* from Bleda Plana (Eisentraut 1954). He hypothesized that dark phenotypes were induced by a higher consumption of plant material. In contrast, Kramer (1949) suggested an evolutionary explanation: dark colouration/melanism conveyed adaptive advantages through protection from harmful ultraviolet radiation, while enhancing heat absorption during colder days. Later, Hartmann (1953) proposed that mutations that caused melanism originated before the coastal islets were separated from the main islands. The high degree of phenotypic variation (body size and colouration) among coastal islets is now well-established (Pérez-Mellado i Salvador 1988). Several coastal islets host melanic populations of *P. lilfordi*, while a smaller number of islets also host melanic or very dark populations of *P. pityusensis*.

The purpose of the present paper was to investigate the putative association between polymorphism at the *MC1R* locus and colour phenotype in *Podarcis* from the Balearic Islands and therefore establish whether specific substitutions were associated with the melanic colouration of these populations.

Materials and methods

Samples

A sample of 72 individuals from the genus *Podarcis* was analyzed (Table 1). These were: 1) 46 *Podarcis lilfordi* from 13 islands and islets corresponding to 7 light insular forms and 6 dark/melanic insular forms (from Mallorca, Menorca and Cabrera), 2) 22 *P. pityusensis* from 14 populations (from Ibiza and Formentera) with only two dark/melanic insular populations, 3) three *Podarcis tiliguerta* (from Corsica, France), and 4) one *P. filfolensis* (from Comino, Malta). The lizards from Corsica and Comino are light insular forms. A *Podarcis sicula* *MC1R* sequence was also available (Genbank: GU225767). Insular lizard populations were selected so that the most extreme phenotypes were included. All specimens were captured with official permits from national and regional organisms and the lizards released at the point of capture.



Pigmentation variation

Variation in pigmentation of the Balearic populations was classified from previous descriptions (Salvador i Pérez-Mellado 1984; Pérez-Mellado i Salvador 1988). Several colour characteristics were noted (within-islet variation was negligible for these characteristics). They included the presence of brown, black, green on the dorsum, dark/light ventral colouration and the presence of blue, yellow and orange spots (Table 1).

Table 1. Colour patterns of the different lizard populations. Melanic populations are indicated in bold.

| | LOCALIZATION | POPULA-TIONS | DORSAL COLOUR | | | | VENTRAL COLOUR | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------|-------|-------|--------------|----------------|--------|-------|------|------|--------|-----------|---|---|
| | | | Brown | Green | Black | Dominant | Spots | | Light | Dark | Blue | Orange | Blue Occ. | | |
| | | | | | | | Blue | Yellow | | | | | | | |
| <i>Podarcis lilfordi</i> | CABRERA ARCHIPELAGO | Cabrera | x | x | | Brown | | | x | | x | | x | | |
| | | Foradada | | | x | Black | x | | | x | x | | | | |
| | MALLORCA | Dragonera | x | x | | Brown | | | x | | | x | x | | |
| | | El Toro | x | | | Brown | | | x | | | | x | | |
| | | Colomer | | | x | Black | | | | x | x | | | | |
| | | Guardia | | | x | Black | x | | | x | x | | | | |
| | | Moltona | | | x | Black | x | | | x | x | | | | |
| | | Malgrats | x | x | | Black | | | | x | x | | x | | |
| | MENORCA | Addaia | x | x | | Green | x | | x | | | | x | | |
| | | Binicodrell | x | x | | Brown | x | | | x | | x | x | | |
| | | Rei | x | x | | Brown | x | | x | | | | x | | |
| | | Sanitja | x | x | | Brown | | | | | | x | | | |
| | | Aire | x | | x | Black | x | | | x | x | | x | | |
| | <i>Podarcis pityusensis</i> | IBIZA | Alga | x | x | | Brown | | | x | | | | x | |
| | | | Bosc | x | x | x | Green | x | | | x | | x | x | |
| | | | Conillera | x | x | | Green | x | x | x | | x | | x | |
| | | | Dau Gran | | x | x | Green | x | x | | x | x | | x | |
| | | | Eivissa | x | x | | Green | | | x | | | | x | x |
| | | | Espartar | x | x | x | Green-Brown | x | x | | x | x | x | x | |
| Espalmador | | | x | x | | Green | | | x | | | | x | | |
| S. Josep | | | x | x | x | Green | | x | x | | | | x | x | |
| Bleda Plana | | | | | x | Black | | | | x | x | | | | |
| Escull Vermell | | | | | x | Black | x | | | x | x | | | | |
| FORMENTERA | Cap Barberia | x | x | x | Green | x | | x | | | x | x | | | |
| | P.Trocadors | x | x | | Brown | | | x | | | x | x | | | |
| | Sa Pujada | x | x | x | Green | x | | x | | | x | x | | | |
| | St F. Xavier | x | x | | Green | x | x | x | | x | | x | | | |
| <i>Podarcis tiliguerta</i> | Foradada | x | x | | Brown | x | | x | | | | x | | | |
| | Padodell | x | x | | Brown | x | | x | | | | x | | | |
| | Stramari | x | x | | Brown | x | | x | | | | x | | | |
| <i>Podarcis filfolensis</i> | Comino | x | x | x | Brown | x | | x | | | x | x | | | |

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA was extracted during previous conservation genetics projects that were aimed at identifying the mtDNA diversity within these lizards to underpin conservation strategies by the Balearic Islands Autonomous Government (Salvador i Pérez-Mellado 1984; Pérez-Mellado i Salvador 1988). A 720 bp fragment of *MC1R* gene was amplified with the forward primer MC1R-PF 5'-GGCNGCCATYGTCAANAACCGGAACC-3' and the reverse primer MC1R-PR 5'-CTCCGRAAGGCRATAATNATGGGGTCCAC-3' (modified from Pinho *et al.* 2010). A second pair of primers was designed from the *Podarcis sicula* sequence to obtain the complete *MC1R* sequence (944 bp). The forward primer was 5'-ATGTCTGTGCCATCACCCCT-3' and the reverse primer was 5'-GGTTCCGGTTCTTGACAATGGCNGCC-3'. The same PCR conditions were used for both sets of primers.

PCR reactions were performed in 25 µl volumes with 80 ng DNA, 1x PCR Buffer, 0.4 mM dNTPs, 0.3 µM of each primer and 0.5 units of DNA polymerase. PCR conditions were: 5 min at 92 °C, 35 cycles of 30 s at 92 °C, 30 s at 56 °C, 90 s at 72 °C; 5 min at 72 °C. PCR products were purified using the Invitex MSB® Spin PCRapace (Invitex GMBH, Berlin, Germany). Both heavy and light strands were sequenced on an automated ABI 3130 sequencer using a Big Dye® v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). Sequence data have been deposited at the GenBank data library under accession numbers JX126622-JX126693.

The following partial mitochondrial genes were also amplified using PCR and sequenced: 12S rRNA, cytochrome *b* (two regions obtained separately), control region and an 800 bp (ND) fragment that included part of the ND1 gene, three tRNA genes, tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln}, and tRNA^{Met} and part of the ND2 gene. The total length of mitochondrial sequence analyzed for each animal was 2370 bp. We sequenced individuals from *P. pityusensis* (GenBank access EF694768, EF694794, EF694817, EF990552, EU006717, JX852045, JX852048, JX852051-JX852053, JX852055, JX852057-JX852059, JX852063, JX852066, JX852081, JX852091, JX852093-JX852094, JX852099, JX852104, JX852118, JX852120, JX852122-JX852123, JX852125, JX852127, JX852129), from *P. tiliguerta* (GenBank access JX852110-JX852111, JX852113-JX852114, JX852116-JX852117, JX852139-JX852141) and *P. filfolensis* (GenBank access JX852109, JX852112, JX852115, JX852138). Previously published *P. lilfordi* sequences (Terrasa *et al.* 2009) have also been used in this study.

Haplotype phases for *MC1R* were resolved for heterozygotic individuals using DnaSP software v5.10 (Librado i Rozas 2009) which implements an algorithm from the program PHASE (Stephens *et al.* 2001; Stephens i Donnelly 2003; Stephens i Scheet 2005). The same software was used to obtain estimates of sequence diversity and compute the nucleotide diversity at synonymous, nonsynonymous, and silent sites, following Nei and Gojobori (1986). Neutrality was tested with Tajima's D test (Tajima 1989) and Fu's F test (Fu i Li 1993) using DnaSP (Librado i Rozas 2009).

A *MC1R* haplotype network was constructed using the program TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000) to examine whether or not melanism was associated with the overall *MC1R* genealogy. TCS creates a network using statistical parsimony



(Templeton *et al.* 1992; Templeton i Sing 1993). The probability of parsimony for linking haplotypes was set at the 95% level.

Phylogenetic trees were obtained using Bayesian inference on the haplotypes (MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck i Ronquist 2001). Two MCMC samplers were run in parallel (4 chains each, temp parameter set at 0.2) starting from a random tree for 1.3×10^6 generations (samples recorded every 100 generations). In both sampling runs, stationarity of the Markov Chain was determined by stable split-standard deviations and stable sampled log likelihood values. The posterior sample of trees that followed burn-in were combined into a majority-rule consensus tree and used to estimate posterior node probabilities.

Results

Population colour classifications are shown in **Table 1**. Non-Balearic island specimens were similarly classified. Assignment of the 27 Balearic populations to melanic and non-melanic sets is shown in **Table 1**. Within the melanic group (8 populations); Foradada, Guardia, Moltona, Aire and Escull Vermell islands show blue spots. Melanic individuals from Aire and Malgrats populations also show brown dorsal spots and blue ventral ocelli. The non-melanic group comprises 19 populations. In this group, the most dominant dorsal colour is green (10 populations); followed by brown (8 populations). The presence of black, blue and/or yellow spots is less common. In general, non-melanic populations have light ventral colour.

The 720 bp *MC1R* sequence provided 146 haplotypes, corresponding to 45 segregating sites, across *P. lilfordi*, *P. pityusensis*, *P. filfolensis* and *P. tiliguerta* specimens. The observed changes are displayed against the *P. sicula* reference sequence (**Table 2**). There were 32 synonymous and 13 nonsynonymous substitutions. We show the locations of nonsynonymous substitutions on the *MC1R* protein (**Figure 1**). Substitutions which encode for different amino acids are V88I, V92E, V92L, D116N, I139V, F146L, M202V, Q210H, C250W, F255C, T263S, C272S, and A296P, mostly corresponding to the transmembrane domain of the protein.

Two C-T transitions at sites 483 and 696 are specific to *P. tiliguerta*, and they represent synonymous substitutions: Val¹⁶¹ and Thr²³². Two similar changes at sites 568 and 594 are present in *Podarcis filfolensis*. These changes correspond to Leu¹⁹⁰ and Ile¹⁹⁸.

Six sites (318, 329, 402, 405, 795 and 879) are divergent between *P. sicula* and *P. lilfordi*, *P. pityusensis*, *P. filfolensis* and *P. tiliguerta*. The T-C transition at site 329 is the only non-synonymous change. However, sites 318, 402 and 405 are not variable in *P. filfolensis*. Two populations of *P. lilfordi* (Addaia and Binicodrell) did not show substitutions at site 318. Thirty-nine sites within the *MC1R* gene fragment were variable within one (or more) of the insular populations of the Balearic Archipelago. Three sites in the *MC1R* sequence could be considered potential mutational hot spots (SNPs): c.390A>R, c.645C>Y and c.804C>Y positions.

We tested for associations between *MC1R* variants and colour categories. First, we examined whether any specific changes in the sequence were associated with melanic phenotypes. No substitutions were common to all melanic individuals. A contingency table test was used to analyze possible associations between each polymorphic positions and the melanic phenotype. The only significant deviation association was detected in the 681nt ($\chi^2=25.17$, $P<0.001$) but this was an A/G synonymous change. Alleles containing an A were more abundant in melanic populations.

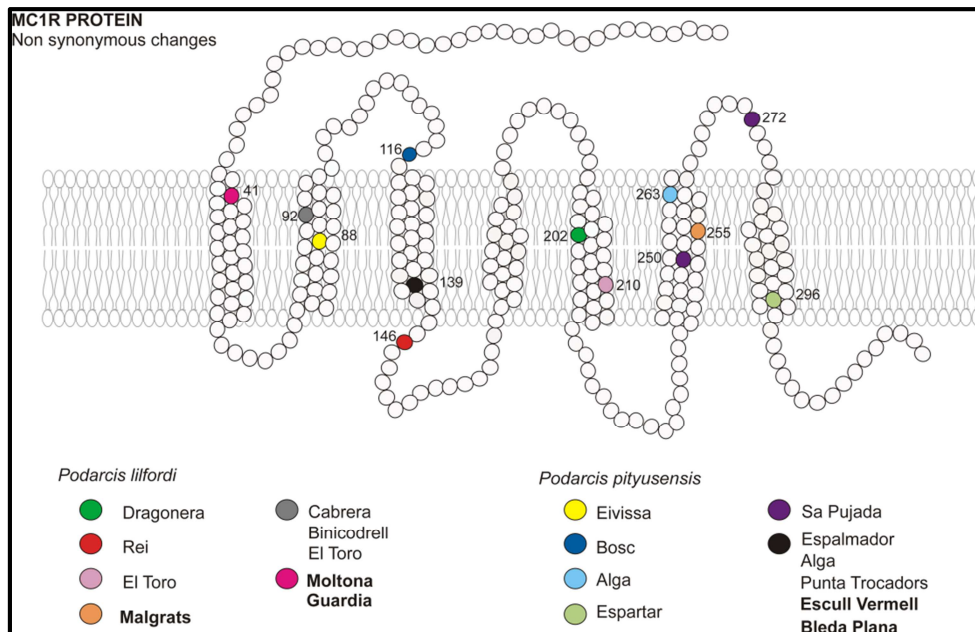


Figure 1. *MC1R* amino acid substitutions detected in *P. lilfordi* and *P. pityusensis*, and their locations relative to the cell membrane (modified from Garcia-Borrón *et al.* (2005)). Melanic populations are indicated in bold.

The DNA network results are shown in **Figure 2**. The melanic populations of Foradada, Colomer, Guardia and Moltona (*P. lilfordi*) share some common synonymous changes at Thr¹¹¹ and Ser²²⁷. However, these substitutions are not shared with the *P. lilfordi* from Aire and Malgrats, or Escull Vermell and Bleda Plana melanic populations of *P. pityusensis*.

We also examined whether substitutions in the first 210 bp of the gene might be associated with melanism by sequencing the entire *MC1R* gene for a smaller group of 6 individuals from three melanic (Moltona, Guardia and Malgrats) and three non-melanic (Cabrera, Dragonera and Formentera (*P. Trocadors*)) islets. Sequences were compared to *P. sicula* sequence and seven substitutions were detected. Six of them were found in all populations and were synonymous: Pro¹⁴, Pro²¹, Asn²⁴, Leu⁴³, Phe⁵² and Lys⁶⁴. One non-synonymous change, G41D, was detected (**Figure 1**). However, this caused an amino acid substitution that had no effect on protein charge. This substitution was observed in the melanic populations from Moltona and Guardia but not in the melanic population from Malgrats. The initial 210 base pairs of the *MC1R*



sequence exhibited no deletion / insertion that may involve a change in the reading frame of the MC1R protein. There were no associations between phenotype categories (green and brown, blue and yellow spots and ventral colour) and the observed amino acid or synonymous substitutions in the *MC1R* gene.

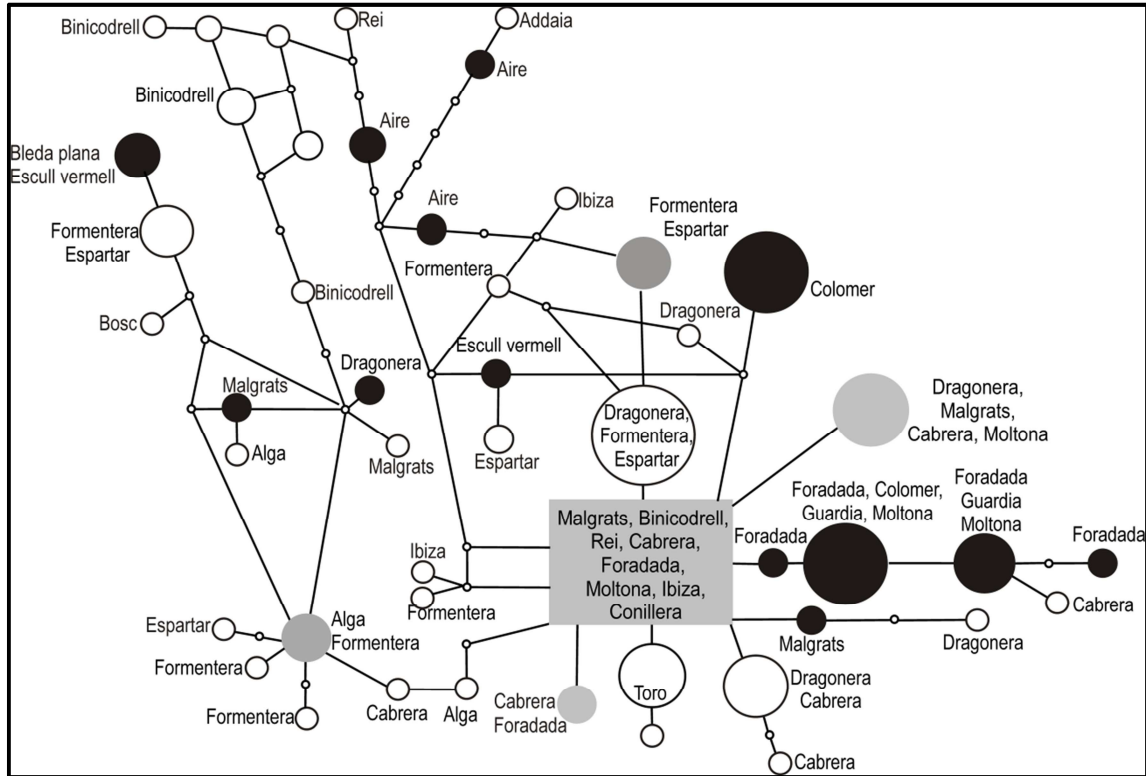


Figure 2. Network showing relationships among *MC1R* haplotypes observed in Balearic populations. Alleles from melanic populations are represented as black circles, and non-melanic populations as white circles. Alleles that were found in both melanic and nonmelanic populations are represented as grey circles.

Gene diversity and selective effects

The mitochondrial gene tree that was inferred for the same individuals is shown in **Figure 3**. The tree is concordant with the two species and also shows clear island phylogeographical patterns within species. Both melanic and non-melanic populations were found in the three main mtDNA lineages in *P. lilfordi* but were only detected within a single mtDNA lineage in *P. pityusensis*. The *MC1R* gene tree shows low posterior support for some nodes. However, splits in the tree do not correspond to melanic/non-melanic population divisions. Unlike the mtDNA tree, the major split within the tree does not correspond to the two species.

Table 2. Synonymous and nonsynonymous (in bold) changes. Melanic populations are underlined.

| Populations | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-----------|---------|--------|-------------|-----|---------|------|------|-----------|----------|---------|----------|------------|----------|-------------|--------------|-----------|--------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-------------|--------------------|-------------------|
| Cabrera | Dragonera | El Toro | Addaia | Binicodrell | Rei | Sanitja | Alga | Bosc | Conillera | Dau Gran | Eivissa | Espartar | Espalmador | S. Josep | C. Barberia | P. Trocadors | Sa Pujada | St F. Xavier | P. tiliguerta | P. filfolensis | <u>Foradada</u> | <u>Colomer</u> | <u>Guardia</u> | <u>Moltona</u> | <u>Malgrats</u> | <u>Aire</u> | <u>Bleda Plana</u> | <u>E. Vermell</u> |
| 180 | C | | | | | | | | | | | G | G | G | | | | | G | | | | | | | G | G | G |
| 210 | G | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | A/G | | | | | A/G | |
| 258 | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | G/C | | | | | | |
| 261 | C | C/T | T | | | | | | | | | | | | | | | | | C/T | | | | | | | C/T | |
| 262 | G | | | | | | | | | | A/G | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 274 | G | | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 275 | T | A/T | | C/T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 298 | C | C/T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | C/T | | | | | | |
| 318 | T | C | C | C | | C/T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 329 | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 333 | C | C/T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | C/T | C/T | T | T | | | |
| 346 | G | | | | | | | | A/G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 351 | C | | | | | | C/T | | | | | C/T | C/T | | C/T | C/T | | | | | | | | | | C/T | C/T | |
| 375 | C | C/T | C/T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | C/T | C/T | |
| 390 | A | A/GA/G | G | G | A/G | G | A/G | | G | A/G | A/G | G | A/GA/G | G | G | G | G | G | G | G | G | A/G | G | A/GA/G | G | | | |
| 402 | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 405 | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 415 | A | | | | | | A/G | | | | | A/G | | | G | | | | | | | | | | | | G | A/G |
| 438 | C | | | | | | G/C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 441 | C | | | T | | | | | | | | | | | | | | | T | C/T | | | | | | C/T | | |
| 445 | T | C | | | | | | | | | | | C/T | C | C/T | C/T | C | | | | | | | | | | | |
| 480 | C | T | C/T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | C/T | | | | | | |
| 483 | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 492 | C | C/T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 540 | C | G/CG/C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | G/C | | |
| 568 | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | C/T | | | | | | |
| 594 | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | C/T | | | | | | |
| 604 | A | A/G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 629 | G | G/C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 645 | C | C/T | C/T | | C/T | | | | | | | C/T | | C/T | C/T | C/T | T | | C/T | | | | | | | C/T | | |
| 681 | G | A/G | | | | | | | | | | | | | | | | | A | | A/GA/G | A | A | | | | | |
| 684 | G | | | A/GA/G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | A | |
| 696 | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | C/T | | | | | | |
| 726 | C | | | C/T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 729 | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | G/T | | | | | |
| 735 | C | | | C/T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | T | |
| 750 | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | G/C | | | | | | |
| 764 | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | G/T | | |
| 787 | A | | | | | | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 795 | G | C/T | C | C | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 804 | C | C/T | C/T | | | | C/T | T | | | | | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | | | | | | | | | C/T | T | C/T |
| 814 | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | A/T | | | | | | |
| 879 | A | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 885 | C | | | | | | | | | | C/T | C/T | | C/T | | | | | | | | C/T | C/T | C/T | | | | |
| 886 | G | | | | | | | | | | | C | | | | | | | | | | | | | | | | |

Change positions (according to P. sicula)



Table 3 shows the diversity estimates for the *mc1r* gene and the mtDNA. Both loci have greater diversity in *P. lilfordi* than in *P. pityusensis*. Also, the melanic insular populations are less diverse than the non-melanic ones.

No statistically significant signature of selection was detected using Tajima’s D test (Tajima 1989). Values were slightly negative, with the exception of *P. lilfordi* and non-melanic groups that present slightly positive D values for mtDNA. The results from Fu’s and Li’s tests (Fu i Li 1993) were similar, except in the case of the non-melanic group (for the *MC1R* gene), for which F statistic is negative, and significant at 5% ($P < 0.05$).

Discussion

Substitutions in the *MC1R* gene of endangered Balearic Island *Podarcis* lizards do not appear to be related to either melanism or other components of the considerable colour pattern variation among islands.

Recent studies on pigmentation genes and their functions have provided evidence that pigment gene function is largely conserved across vertebrate taxa and can influence adaptive coloration, often in predictable ways (Hubbard *et al.* 2010). The *MC1R* gene is highly conserved among vertebrates and has a relatively simple genetic structure, which has facilitated its identification in a diversity of taxa, including lizards. The majority of these studies try to associate a punctual non-synonymous sequence change with a discrete colour polymorphism, and in some case identical mutations at homologous positions in diverse taxa can lead to the same or similar phenotypes (Hubbard *et al.* 2010).

The *MC1R* gene is polymorphic in the studied populations. We found 45 variable positions with respect to the published *MC1R* gene sequence of *P. sicula* and three of these positions could

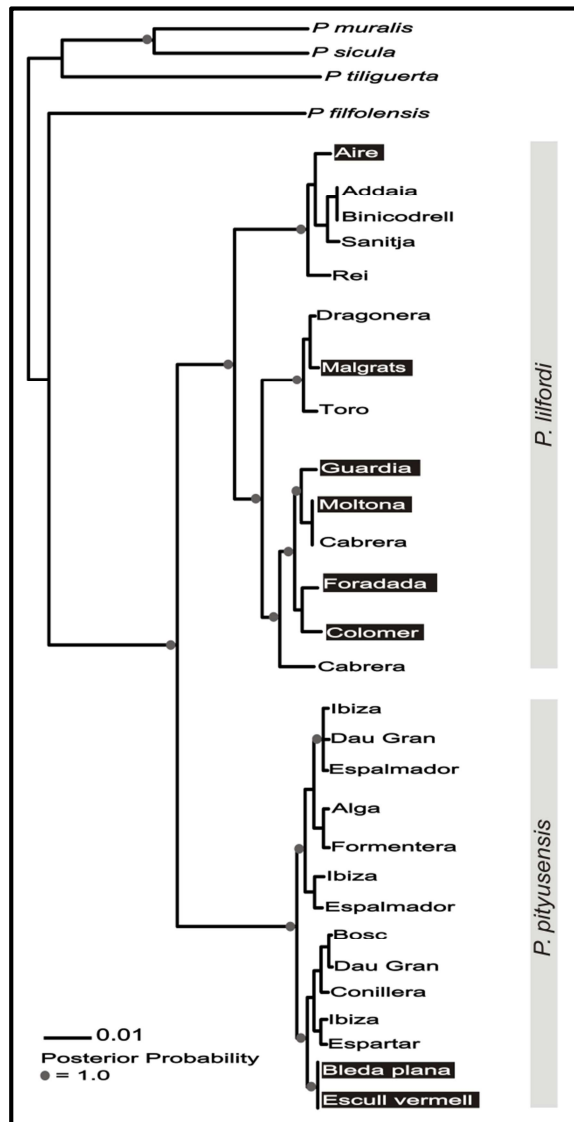


Figure 3. The mtDNA consensus tree inferred by Bayesian inference. Melanic *P. lilfordi* / *P. pityusensis* populations are highlighted in black. Circles are placed on nodes in which posterior probabilities were ≥ 0.9 .

be considered as hot spots due to their high mutation frequency. As expected under neutral evolution, synonymous changes are most numerous but thirteen substitutions encode for different amino acids, and most of them correspond to the transmembrane domain of the protein. Much of the genetic diversity in *mc1r* appears to reflect the patterns observed in the mtDNA, which have been interpreted in terms of the historical biogeography of these species (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009). For example, *P. lilfordi* shows much greater genetic diversity (in both loci) than *P. pityusensis*. Previous mtDNA analyses showed that was likely to have originated from ancient isolation on the major islands of Mallorca, Menorca and Cabrera during the Pliocene (Brown *et al.* 2008; Terrasa *et al.* 2009).

Nunes *et al.* (2011) detected two associations between *MC1R* variants and ecologically relevant phenotypes in the European ocellated lizard *Lacerta lepida*, a genus related to *Podarcis*. The first is a non-conserved and derived substitution (T162I) associated with the presence of brown scales (“*nevadensis*” phenotype), while the second substitution (S172C) was associated with the presence of black scales in both *L. l. lepida* and *L. l. iberica*. However, they did not detect mutations associated with the higher proportion of black in *L. l. iberica*. Here, the nucleotide positions 162 and 172 were not variable among the very polymorphic populations of *Podarcis*.

With some exceptions (Anderson *et al.* 2009) melanism is also associated with substitutions at the *MC1R* locus in a variety of mammals and birds, including domestic (Kijas *et al.* 1998; Kerje *et al.* 2003) and wild species (Nachman *et al.* 2003). In this case structural mutations (deletions) are seen as responsible for the melanic phenotype. Melanic populations of *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis* showed no deletions in the *MC1R* gene sequence. The unique substitutions that we have observed in the melanic populations: Foradada, Colomer, Guardia and Moltona (*P. lilfordi*), are synonymous changes at Thr¹¹¹ and Ser²²⁷. However, the *P. lilfordi* Aire and Malgrats island populations, and the *P. pityusensis* Escull Vermell and Bleda Plana island populations, are melanic, but do not share these substitutions. It is therefore very difficult to believe they play a role in melanism in any of these species.

The presence of a dark phenotype has been hypothesized to be a relict character in cordylic lizards (Daniels *et al.* 2004). It has also been suggested that it may be subject to selection due to its impact on thermoregulation in the genus *Podarcis* (Kramer 1949). Given the low prevalence of melanism in other *Podarcis*, it seems unlikely that melanism is the ancestral condition for these species. If we assume that the mtDNA branching pattern reflects the true species/population history then the most parsimonious explanation is that the ancestral condition is the non-melanic colour seen in most other *Podarcis* from which melanism has evolved several times within the Balearic *Podarcis* clade. Furthermore, we did not detect evidence of selection in melanic populations.

It therefore appears that other loci are involved in lizard coloration. For example, agouti signaling protein (*ASIP*) is important in melanin synthesis and multiple mutations in this gene are associated with colour variation. However, compared with *MC1R*, far fewer studies have been carried out on wild populations and



also the molecular changes associated with colour are different, both coding and regulatory regions have been implicated. To date, agouti-like sequences have not been reported in reptiles. In addition to melanin pigments, animal coloration can involve carotenoid pigments and pterins, but the genetic mechanisms involved in these pathways are poorly understood (Hubbard *et al.* 2010).

Table 3. Genetic diversity parameters based on *MC1R* gene sequences (720 bp) and mtDNA (2370 bp). The melanic individuals belong to *P. lilfordi* and *P. pityusensis* insular populations.

| | <i>MC1R</i> | | | | | | | | mtDNA | | | | | | | |
|--------------------|-------------|----|----|------------------|-------|------------------|----------------------|----------------------|-------|-----|----|------------------|---------|------------------|----------------------|----------------------|
| | N | S | h | Hd | K | Pi | D | F | N | S | h | Hd | K | Pi | D | F |
| <i>P. lilfordi</i> | 92 | 30 | 35 | 0.955 (0.009) | 3.634 | 0.005 (0.001) | -1.242 ^{ns} | -1.237 ^{ns} | 36 | 154 | 23 | 0.965 (0.016) | 47.535 | 0.020 (0.001) | 0.929 ^{ns} | 1.271 ^{ns} |
| <i>P. pityus.</i> | 44 | 14 | 23 | 0.958 (0.014) | 3.050 | 0.004 (0.001) | -0.163 ^{ns} | -0.324 ^{ns} | 21 | 45 | 17 | 0.976 (0.023) | 9.533 | 0.004 (0.001) | -0.943 ^{ns} | -1.386 ^{ns} |
| Other species | 8 | 12 | 6 | 0.929 (0.084) | 4.464 | 0.006 (0.001) | -0.178 ^{ns} | 0.025 ^{ns} | 4 | 259 | 3 | 0.833 (0.222) | 136.500 | 0.058 (0.023) | -0.537 ^{ns} | -0.595 ^{ns} |
| Melanic | 44 | 22 | 18 | 0.900 (0.031) | 3.476 | 0.005 (0.001) | -1.029 ^{ns} | -1.143 ^{ns} | 18 | 202 | 10 | 0.935 (0.032) | 56.451 | 0.024 (0.005) | -0.244 ^{ns} | 1.143 ^{ns} |
| Non melanic | 92 | 34 | 43 | 0.968 (0.007) | 3.582 | 0.005 (0.001) | -1.493 ^{ns} | -1.972* | 39 | 226 | 30 | 0.977 (0.014) | 78.260 | 0.033 (0.002) | 1.591 ^{ns} | 1.424 ^{ns} |

N= number of sequences; S= number of segregating sites; h= number of haplotypes; Hd= haplotype diversity; K= number of pairwise differences; Pi= nucleotide diversity; D= Tajima's D (1989); F= Fu's F and Li's F (1993); SE= standard error (indicated in parentheses).

^{ns} not significant, * P<0.05

Balearic Island *Podarcis* lizards exhibit a wide variety of colour variants, with morphs ranging from completely melanic to quite light-coloured individuals, and with green-brown pigmentation being the most frequent. Sequencing of the *MC1R* gene in individuals with different morphological phenotypes has not revealed a clear correlation between mutations and/or deletions and these different colour morphs.

Acknowledgements

This work has been financed by the research funds CGL2006–10893 and CGL2009-12926 of the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and European Union FEDER funds. VR is supported by a grant from Direcció General URT (Govern de les Illes Balears) and European Union FSE. All specimens were captured with official permits from national and regional organisms. In Malta, *Podarcis filfolensis* specimens by MEPA (Environment Protection Directorate of Malta), permit: NP00051/07 for field work during May 2008, in Corsica, the *Podarcis tiliguerta* specimen by CERFA from Corsican Regional Government, permit No. 13616*01 for field work in May 2011 and in Balearic Islands, specimens from *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis* species, from Conselleria de Medi Ambient, permit: CAP09/2010 for field work during the whole 2010.

Melanism in insular lizards: No differential *MC1R* gene expression but differences in metabolic rate and inflammatory response detected by transcriptome analysis

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

Abstract

Squamates exhibit a remarkable variety of colours patterns, including melanism. The melanogenesis pathway involves a large number of genes, but one of the most important is the Melanocortin-1 receptor (*MC1R*). Melanism-associated mutations have been described in the coding region of this gene, as well as in associated regulatory regions. Some populations of the Balearic island lizards *Podarcis lilfordi* and *P. pityusensis* are melanic but a previous study found no relationship between *MC1R* SNPs and melanism in these species. Here, mRNA expression levels of *MC1R* in tail tissue were examined in melanic and non-melanic) of Balearic *Podarcis* lizards. *MC1R* expression was not found to be higher in melanic phenotypes. Two libraries (corresponding to melanic and non-melanic lizards) were analysed using IonTorrent sequencing technology. A total of 91 genes showed differential gene expression between melanic and non-melanic individuals ($P < 0.005$), of which 46 genes gave non-redundant values. A total of 33 genes were up-regulated (highly expressed in non-melanic samples) and 13 were down-regulated. We detected over-expression in non-melanic individuals in two groups of genes: i) the antigen processing via MHC II gene, and ii) two genes associated with Wnt signalling functions, both of which indicated a reduced inflammatory response in melanic compared with non-melanic individuals. Melanic individuals also showed evidence of higher metabolic rates (more expression for regulation carbohydrate transport, ATPase activity and fat cell differentiation) which could be potentially linked with changes in energy budget. Despite finding differences in expression, our study was unable to reveal major insights into the genetic basis of melanism in these island lizards.

Key words: differential gene expression, *MC1R*, melanism, *P. lilfordi*, *P. pityusensis*, transcriptome profile.

Short running head: Melanism: Transcriptome and *MC1R* expression.



Introduction

Chromatic variation is one of the most perceptible phenotypic traits in animals. Lizards and snakes present a wide range of colour patterns due to a complex pigmentary system (Saenko *et al.* 2013; San-Jose *et al.* 2013). This has often been interpreted as examples of adaptive evolution associated with habitat, behaviour, reproductive strategies and speciation (Cooper i Greenberg 1992; Vercken *et al.* 2007; Olsson *et al.* 2013).

Colour variation can be due to several causes. Associations between environmental variation and the presence of melanin-based colour polymorphism due to local adaptation have been examined by many studies (e.g., see review by Trullas *et al.* 2007; Roulin *et al.* 2008). Differences in blacks/browns/whites/yellows and reds are generally due to differences in underlying pigmentation with differential deposition of reddish-brown pheomelanin and black/grey eumelanin pigments being particularly important (Majerus 1998).

Melanocortin-1 receptor (*MC1R*) plays an important role in inducing eumelanin production and blocking the production of pheomelanin and therefore may be very important in cases of melanism (Fontanesi *et al.* 2009). In contrast, agouti signaling protein (*ASIP*) has the opposite effect. Some studies have suggested, without direct evidence that lineages generally referred to as reptiles do not produce pheomelanin (Grether *et al.* 2004; Rosenblum *et al.* 2004). However this idea has recently been rejected as substantial amounts of this pigment have been detected in Hermann's Tortoise (Roulin *et al.* 2013). Mutations in the coding region of the *MC1R* gene, or differential gene expression in its production or that of their ligands (MSH, melanocyte-stimulating hormone) or antagonists (*ASIP*), are therefore potential causes of melanism in reptiles (Steiner *et al.* 2007; Fulgione *et al.* 2015).

Changes in reptile colouration may be due to processes such as the production of melanin mediated by testosterone, and stress condition. However in some lizards, variation colouration has been linked to the *MC1R* gene (Rosenblum *et al.* 2004; Manceau *et al.* 2010; Kronforst *et al.* 2012). Nevertheless, the relationship between genetic changes (mutation and/or regulation) and variability in patterns of colouration are still largely unexplored. In birds, significant melanism-associated mutations have been described in the coding region of the *MC1R* locus, such as nonsynonymous mutations and INDELS (insertion-deletion), as well as in regions that regulate expression of *MC1R* (McRobie *et al.* 2009; Guo *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013). Recently other type of processes have been suggested to explain the presence of melanism in squamates, based on the composition of their dermal layer (Kuriyama *et al.* 2013, 2016). These studies found only melanophores in melanic skink and snake species, whereas normal phenotypes exhibit three types of chromatophore: xanthophores, iridophores and melanophores.

There are two sister species of the lizard genus *Podarcis* in the Balearic archipelago: *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis*. Melanic populations were first described in the 1930s (Eisentraut 1949). For example, well-known melanic populations

include *P. lilfordi*, from the islets of Aire (Minorca) and Foradada (Cabrera archipelago) and *P. pityusensis* from the islets of Bleda Plana and Escull Vermell (Ibiza Island). Different hypotheses have been forwarded to explain the existence of dark phenotypes. These include: 1) the inheritance of melanism as an ancestral condition, 2) high consumption of vegetable matter and 3) protection from ultraviolet radiation (Kramer 1949; Eisentraut 1954).

In a previous study we employed a candidate gene approach but found no association between SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) within the *MC1R* locus and melanism in these species (Buades *et al.* 2013). Here we attempted to extend this investigation by investigating *MC1R* expression profiles. Transcript profiling is a powerful approach for identification of genes expressed in various tissues, including skin. Although this approach has been used in commercial species (Tae-Hun *et al.* 2006; Fan *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2015) very few studies (as Kingsley *et al.* 2009; Fulgione *et al.* 2015) have used it to examine differences between natural populations of melanic and non-melanic individuals. We analyzed differences in transcriptome profiles between melanic and non-melanic *Podarcis*, using RNA sequencing. Both approaches will provide novel insights into differences in gene expression associated with black skin colour.

Material and Methods

Sampling

Lizards were caught by careful noosing. Light finger pressure on the tail tips caused tail autotomy. We were careful to remove only a minimal amount of tail tissue (not exceeding 8 mm) and lizards were immediately released without sampling if they showed any signs of stress. All lizards were released at their points of capture.

MC1R expression analysis

A total of 21 melanic and non-melanic individuals from both *P. pityusensis* and *P. lilfordi* (see **Table 1**) were analysed. The melanic group included 11 individuals from Moltona (7) and Aire (4) islands, the non-melanic group included 10 individuals from Punta Trocadors, Formentera) (3) and Rei, Menorca (7). Typical colouration within these populations is shown in **Figure 1**.

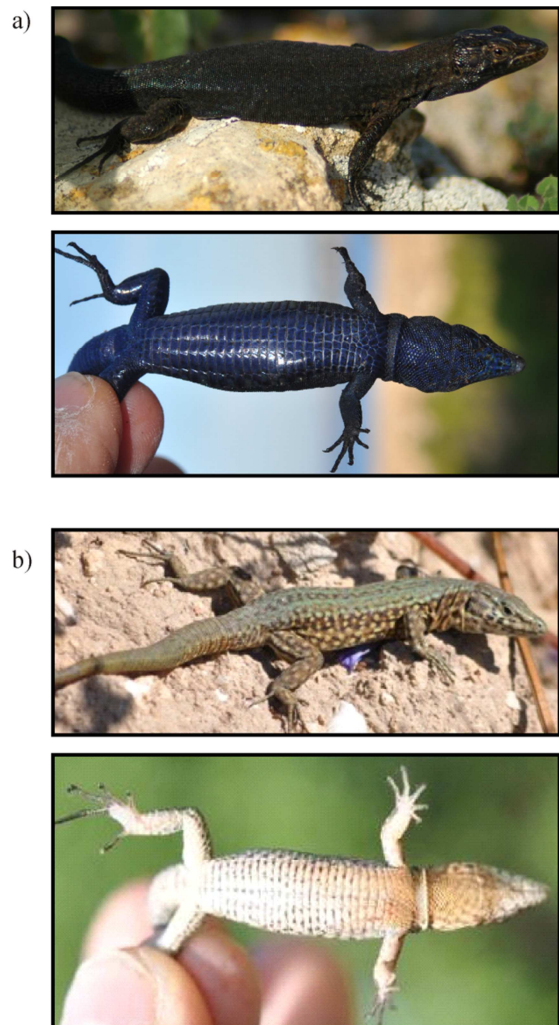


Figure 1. Representative phenotypes of a) melanic and b) non-melanic samples.



Table 1. Samples analysed: phenotype and localization.

| Specie | Population | Localization | N | Phenotype |
|-----------------------------|-----------------|--------------|---|-------------|
| <i>Podarcis pityusensis</i> | Punta Trocadors | Formentera | 3 | Non-melanic |
| <i>Podarcis lilfordi</i> | Rei island | Menorca | 7 | Non-melanic |
| | Aire island | Menorca | 4 | Melanic |
| | Moltona islet | Mallorca | 7 | Melanic |

After harvesting, tissues were immediately stored in RNAlater® Tissue Protect Tubes (QIAGEN). Total RNA was extracted from tail tissue using an RNeasy® Midi Kit (QIAGEN). The RNA concentration was estimated using Nanovue Plus (GE Healthcare) and the quality of the samples was assessed with a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide. Prior to reverse transcription, samples were treated with DNase I (Sigma-Aldrich) following manufacturer conditions. 100 ng of total RNA, was converted by reverse transcription into cDNA using All-in-One cDNA Synthesis SuperMix (Biotool.com), according to the manufacturer’s standard protocol.

Real-time quantitative PCR (qPCR) was carried out on the LightCycler 480 System (Roche). The gene β -actin (*ACTB*) was used as an internal control, to normalize the results of the *MC1R* gene expression. Primers used in qPCR were (Fulgione *et al.* 2015): 1) For the target gene, *MC1R*: the forward primer was 5'-TGGAGACCCTCTTCATGCTTCT-3' and the reverse primer was 5'-GCTGCAGATCAGCATGTCCA-3'; and 2) for the reference gene, *ACTB*: the forward primer was 5'-GATCTGGCACCACCTTCT-3' and the reverse primer 5'-TCTTTTCTCTGTTGGCTTTGG-3. A fragment of 101pb of the target gene *MC1R* was amplified. qPCR was performed in a final volume of 20 μ l, with 2 μ l of cDNA, 0.8 μ l of each primer (10 μ M), 10 μ l of SYBR Premix EX Taq TM II 2x (TaKaRa) and 6.4 μ l of sterile water. The PCR was initiated with a 30 s hold at 95 °C, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 20 s.

After amplification, the samples were heated to 95 °C for 5 s, 65 °C 1 m and 97 °C and then cooled to 40 °C for 30 s to obtain the melting curve for the SYBR Green. Each sample was analyzed in duplicate. No-RT and no-template controls were included in all experiments.

To analyze *MC1R* expression, Ct values (threshold cycle) obtained from the qPCR, were used. For each sample the average Ct was calculated between replicates of the *MC1R*. We normalized average Ct values for target gene using the average Ct value of the reference gene, *ACTB*. It should be noted that lower Ct values indicated higher levels of gene expression. Relative quantification was conducted using the standard $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak i Schmittgen 2001) and the Pfaffl method (Pfaffl 2001) and normalized expression values were measured relative to a non-melanic sample. PCR

efficiencies were calculated using a 1:10 dilution series run in triplicate for each gene. Fold change values in expression levels in melanic and non-melanic groups did not approximate to a Normal distribution (Shapiro Wilk's test: $P < 0.05$), and so a Mann-Whitney test was used to compare medians between melanic and non-melanic groups (SPSS v11.0, SPSS Inc., Chicago).

Exome analysis

Six *P. lilfordi* specimens, three of them melanic (N1, N2, N3 from Moltona Island) and three non-melanic (C1, C2, C3 from Dragonera Island), were collected for this study. 250 mg of lizard tail tissue, for each individual and phenotype, were used for RNA isolation (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit, QIAGEN). RNA integrity was analysed using an Experion Bioanalyzer (BIO-RAD). RIN values (only samples with RIN>8 were selected) and OD 260/280 ratios for each sample are indicated in **Table 2**. RNA pools were concentrated using the RNA Mini spin clean up kit (QIAGEN) in order to reach the minimum amount to build the sequencing library.

Table 2. Characteristics of the analysed samples.

| Colouration | Sample | Concentration (ng) | 260/280 | RIN |
|-------------|--------|--------------------|---------|------|
| Non-melanic | C1 | 1004.00 | 1.96 | 9.50 |
| | C2 | 460.00 | 1.94 | 9.30 |
| | C3 | 1002.00 | 1.66 | 9.70 |
| Melanic | N1 | 842.06 | 2.03 | 9.00 |
| | N2 | 3429.03 | 2.04 | 8.60 |
| | N3 | 1878.06 | 2.03 | 9.70 |

RNA library generation and sequencing

One RNA library per pool was prepared using an Ion Total RNA-Seq Kit v2 following the Ion Total RNA-Seq Kit v2 User Bulletin ("Preparing 300-base-read RNA libraries for sequencing on the Ion PGM™ System"). Both libraries were quantified by an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc, Palo Alto, California) prior to clonal amplification. Emulsion PCRs were carried out using the Ion PGM Template OT2 400 kit as described in the manufacturer's user guide. Library sequencing was carried out in a Ion 318 Chip v2 on the Personal Genome Machine (PGM (IonTorrent™, Lifetechnologies) at Lifesequencing S.L. (Lifesequencing, Valencia, Spain) using the Ion PGM Sequencing 400 kit following the corresponding protocol (Publication Number MAN0007242, Revision 2.0, Lifetechnologies).



Bioinformatics

Read QC

Raw reads were cleaned by removing sequencing adaptors using the program cutadapt version 1.3 (Martin 2011). This removed Empty reads and low quality sequences ($Q < 20$). These reads were visualized prior and after the trimming process using FASTQC version 0.10.1.

Reference Transcriptome

Clean reads from both libraries were mixed and assembled using Abyss version 1.3.6 in order to build the reference transcriptome. Transcripts were annotated using BLAST2GO version 2.8 (Conesa *et al.* 2005). The *Anolis carolinensis* genome, AAWZ00000000, was used as reference, although no positive matches were found.

Differential expression analysis

Reads were individually mapped against the reference transcriptome using TopHat version 2.0 (Kim *et al.* 2013) with default parameters, and differentially expressed genes were detected using the limma program from the Bioconductor R package. Functional annotation of the relevant detected group of genes was carried out using BLAST2GO version 2.8 (Conesa *et al.* 2005).

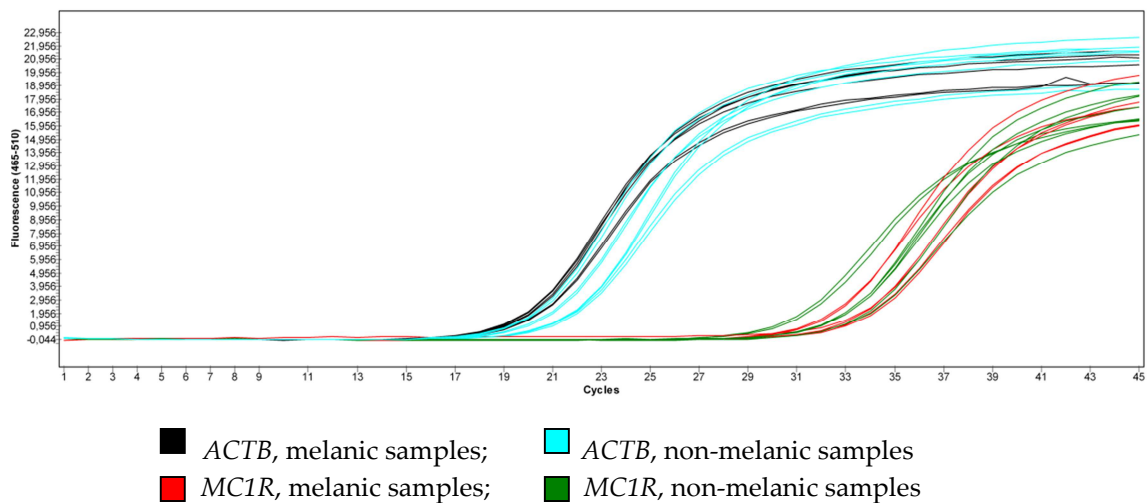


Figure 2. qPCR amplification for MC1R and ACTB for melanic and non-melanic samples.

Results

MC1R expression analysis

The *MC1R* gene expression was analyzed by qPCR on RNAs from tissues of two phenotypes: melanic and non-melanic. The housekeeping gene, *ACTB*, showed a constitutive gene expression with a range of Ct values from 18.7-24.3. There were no significant differences between melanic and non-melanic individuals. A lower number of mRNA molecules were expressed by *MC1R* gene relative to the *ACTB* gene. Ct

values ranged from 29.8-36.6 in non-melanic-samples and from 32-35.8 in the melanic group (**Figure 2**).

The *MC1R* expression $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ analysis indicated fold changes rank of 0.11-1.55 in non-melanic individuals (mean =0.59), but a narrower interval for melanic samples (0.03-0.44, mean=0.15) (**Figure 3**). Similar results were obtained when relative expression values were estimated using the alternative methods described by Livak i Schmittgen (2001) and Pfaffl (2001). Here, a significant difference ($P < 0.05$) was found between melanic and non melanic individuals. Non-melanic specimens showed higher, but more variable levels of *MC1R* expression relative to melanic samples (melanic tissue exhibits fewer mRNA molecules from the *MC1R* gene). Intraspecific differences in *P. lilfordi*, present a wider rank of variation (FC value) than interspecific differences between *P. lilfordi* and *P. pityusensis*, indicating that the greater variability in the expression in non-melanic samples was not due to inclusion of two different species.

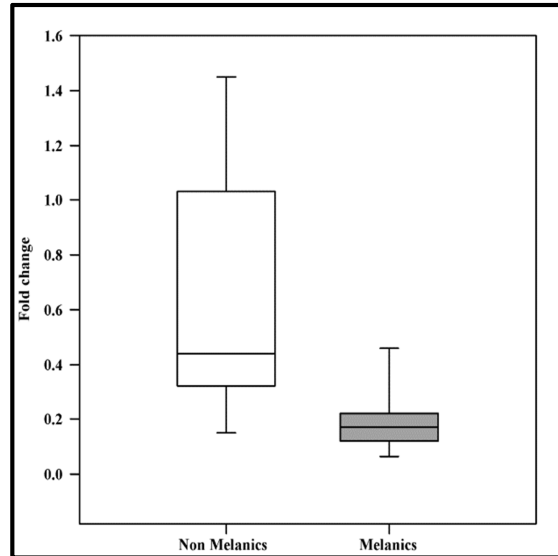


Figure 3. Box plots represent the median value and the distribution of the fold-change value for each group (SigmaPlot).

Exome analysis

Two normalized cDNA libraries (melanic and non-melanic samples) were constructed and analysed with Ion Torrent. The exome analysis used pool sequencing procedures common in the literature (Fan *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2015). Accurate estimation requires inclusion of many individuals (Schlotterer *et al.* 2014). Our study was clearly limited in this sense due to the endangered nature of Balearic lizards.

Table 3. Reads information for each library.

| Library | Total number | Mean length (nt) | Assembled | Rejected (%) |
|--------------|--------------|------------------|------------|--------------|
| Non-melanic | 3819803.00 | 364.77 | 2536822.00 | 33.60 |
| Melanic | 4479952.00 | 330.00 | 3846865.00 | 14.20 |
| TOTAL | 8299755.00 | | 6383687.00 | |



Collectively, more than 8,000,000 reads averaging 347 nt each were produced (Table 3). The contig lengths ranged from 300 to 600 nt and from 200 to 400 nt, for melanic and non-melanic groups, respectively (Figura 4). Reads with low quality (<Q20), were discarded and non-degenerate positions (N) were found across all amplified bases. A global *de novo* assembly was tested with different programmes, but optimal results were obtained using ABYSS V1.3.6. For the melanic library, 3,846,865 reads were assembled, with an average length of 273 nt and for the non-melanic library, 2,536,822 contigs were assembled with an average length of 257 nt (Table 4). A small number of singletons were detected after the assembly. The singletons represented single reads with insufficient overlap in the assembly and a length >200 nt. Only contigs were used for annotation and all the singletons were discarded. The cDNA sequences were annotated using BlastX, a protein reference database.

Table 4. Summary of the *de novo* assembly data.

| <i>De novo</i> assembly statistics | |
|------------------------------------|----------------------|
| Number of contigs | 7457 |
| Reads assembled | 6383687 (76.91 %) |
| Average contig lengths (nt) | 339 |
| Number of singletons | 73770 (1.16 %) |
| Average singleton length (nt) | 251 |

Blast2GO analyses the relationship between the Gene Ontology (GO) terms and metabolic pathways. The importance of a metabolic process or biological pathway is determined by the number of identified genes and by their relative abundance ratio considering the total number of genes involved in each pathway (Calduch-Giner *et al.* 2013). All of the different GO were assigned to three categories: biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF).

A total of 91 genes had differential gene expression between melanic and non-melanic individuals (with P-value < 0.05). Considering only non-redundant values, 46 differential GO were observed in non-melanic samples: 33 up-regulated and 13 down-regulated. In the BP category, seventeen of 24 different terms were up-regulated and seven down-regulated (indicating greater expression in melanic individuals). In the MF category, seventeen terms are included: twelve are up-regulated and five are down-regulated in non-melanic individuals. Fewer unigenes (5) are differentially expressed in the CC category. Of these, four are up-regulated and just one is down-regulated. For

melanic and non-melanic samples, significantly different GO terms (determined by the LOR (log odds ratio)) for each category are shown in **Figure 5a** and **5b**.

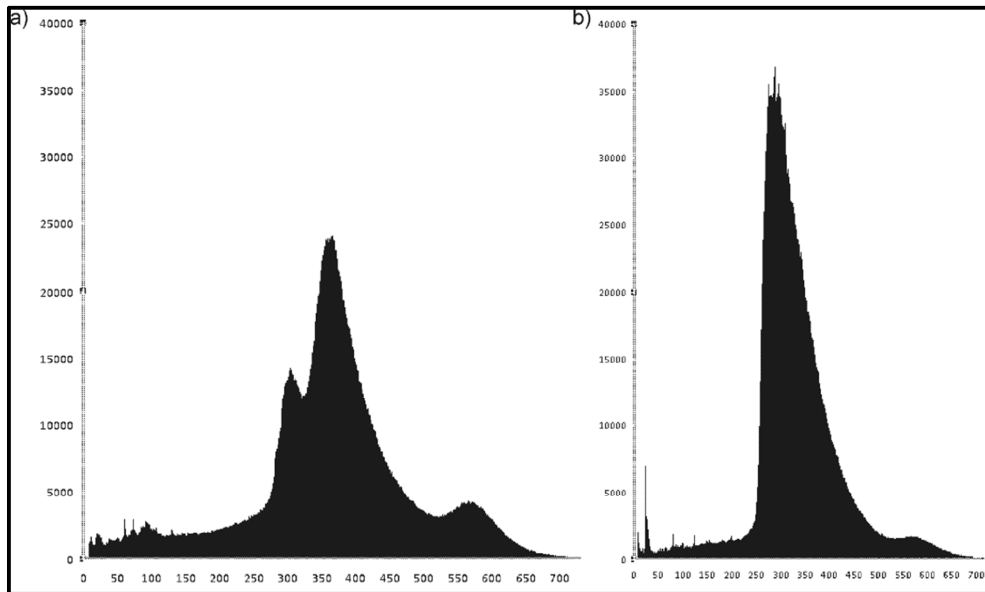


Figure 4. Distribution of the number of reads according to their length: a) Non-melanic library and b) Melanic library.

Significant GO showing greater expression in melanic individuals and non-melanic individuals are listed in Table 5. In melanic lizards they are involved in: positive regulation of locomotion (GO: 0040017), determination of dorsal/ventral asymmetry (GO: 0048262), regulation of glucose transport (GO: 0010827), ATPase activity (GO: 0042625) and fat cell differentiation (GO: 0045444) for Biological Processes (BP) and Molecular Function (MF) GO categories. More transcriptional activity was detected in non-melanic individuals in response to stress (GO: 0006950), detection of stimulus (GO: 0009582 and 0051606) for Biological Processes and receptor activity (GO: 0004872) for Molecular functions.

Despite ostensible differences, no differences were detected by the KEGG (Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) pathway analysis.

Discussion

The presence of melanic individuals is common in various animal species, including reptiles. Genetic alterations (point mutations and/or indels) are responsible for dark phenotypes in some groups, although the causes have not been detected in other groups.

Recently, differential expression of RNA has been analysed using qPCR and RNAseq by numerous studies in an attempt to explain different colour phenotypes. It is well known that RNA expression data are highly dependent on timing and tissue.



However little is known about the timing of melanin synthesis in squamata. Even juvenile lizards have fully developed melanic colouration and so melanogenesis likely occurs quite early during their development, with expression of relevant genes being much-reduced in the adults we sampled. Despite this limitation, most published studies (Saenko *et al.* 2013; Ducrest *et al.* 2014) are made on adult individuals. Here and elsewhere, the use of lizard tails was obligatory because it offers a non-injurious tissue sample. While this is not ideal, it does provide a sample of the dermal layer in which colour differences are generated and similar analyses of tails have detected expression differences between colour morphs of other lizards (Fulgione *et al.* 2015).

Other studies have investigated expression of alternative candidate genes, especially those involved in the melanocortin pathway. Regulation of the *ASIP* gene appears to be important in explaining differences between black and whiter-skinned chickens (Zhang *et al.* 2013, 2015) but this does not seem to be the case in other species (e.g. sheep: Peñagaricano *et al.* 2012). Primers for this gene were designed and tested in our study but no amplification could be obtained and, similar to Bradley *et al.* (2013), the causes were not apparent (i.e., it was not obviously due to primer sequences, alignment, PCR conditions or low gene expression).

Some studies of squamata have carried out histology analyses and found differences between normal colour individuals and melanic ones (Kuriyama *et al.* 2013, 2016). No related work appears to have been carried out on *Podarcis*, but this would be interesting for future studies. It could help indicate the presence/absence of different types of chromatophore and the search for genes implicated in melanism.

It is well known that cutaneous pigmentation is a complex genetic trait involving more than 120 genes, among which *MC1R* plays a key role (Dessinioti *et al.* 2011). Differences in *MC1R* expression have not been observed in many species that exhibit major differences in colouration (e.g. mice (Steiner *et al.* 2007), chickens (Zhang *et al.* 2015), macaques (Bradley *et al.* 2013), raccoon dogs (Han *et al.* 2012), sheep (Peñagaricano *et al.* 2012). However Fulgione *et al.* (2015) found differential *MC1R* expression among white, bright blue and dark blue phenotypes of the lizard *Podarcis siculus*, suggesting that this may be important in this genus. Our current findings are compatible with our previous study and now indicated that melanism in these Balearic species is not due to differences in sequence or expression of the *MC1R* gene.

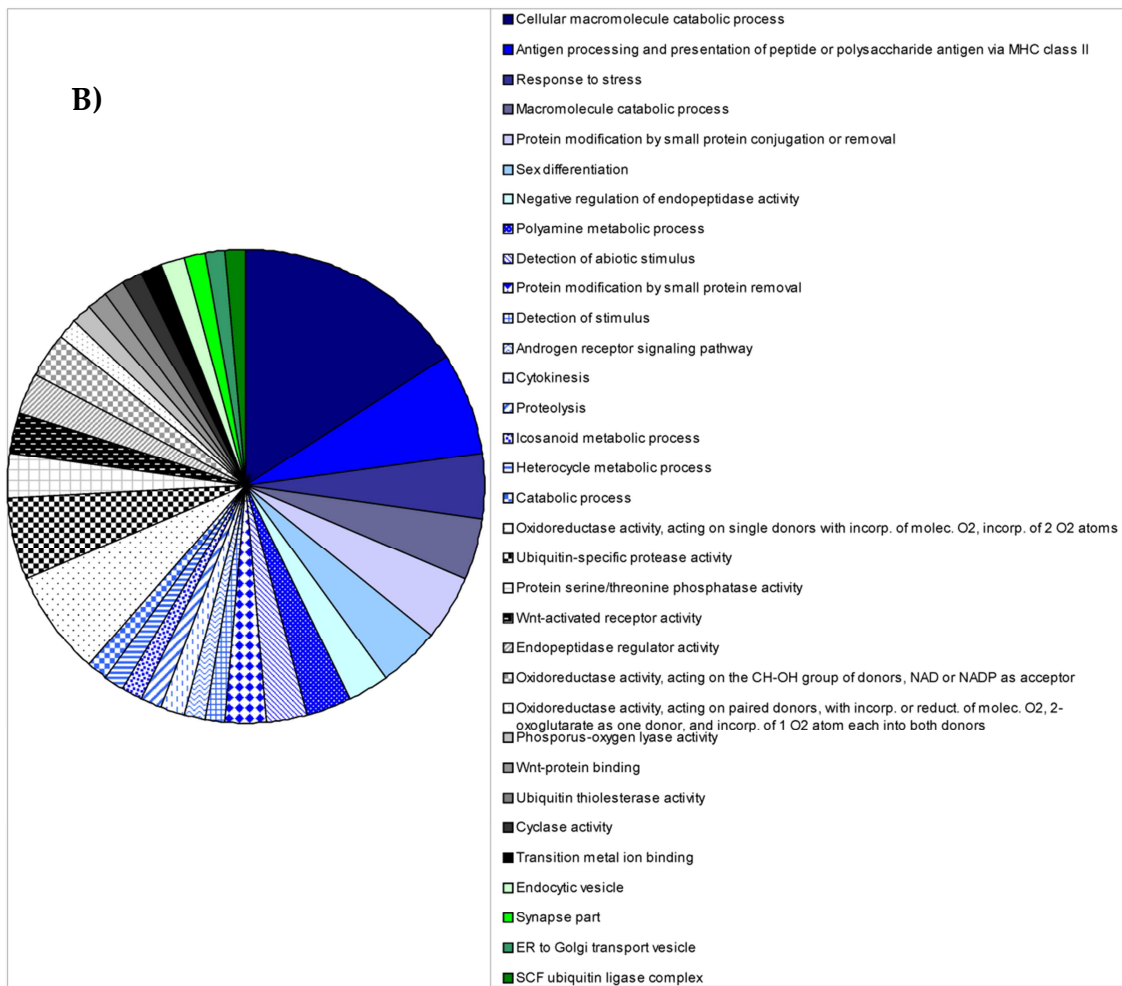
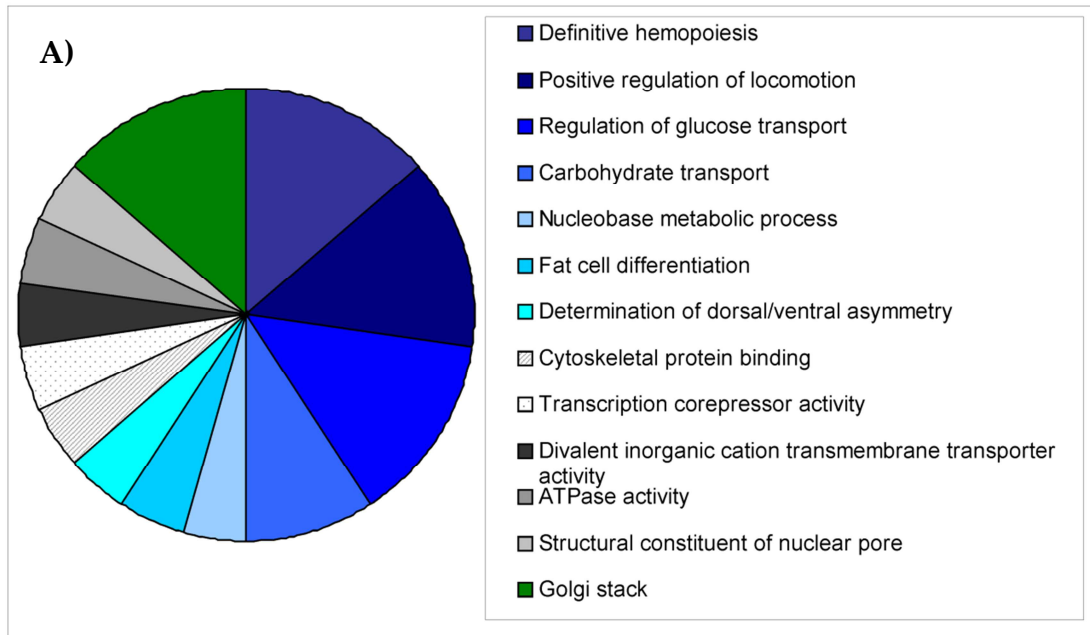


Figure 5. Significantly different GO terms for each category expressed in: a) melanic samples and b) non-melanic samples. The graphic indicates the number of unigenes included in each non-redundant GO term. Categories are: Biological process (coloured in black and grey colour scheme), molecular function (coloured/shadowed in blue colour scheme) and cellular component (green colour scheme).

Table 5. Differential gene expression in melanic and non melanic samples.

| Over-expressed in melanic samples | |
|--|-------------|
| BP (Biological Process) | |
| Positive regulation of locomotion | GO: 0040017 |
| Determination of dorsal/ventral asymmetry | GO: 0048262 |
| Carbohydrate transport | GO: 0015749 |
| Regulation of glucose transport | GO: 0010827 |
| Definitive hemopoiesis | GO: 0060216 |
| Fat cell differentiation | GO: 0045444 |
| MF (Molecular Function) | |
| ATPase activity | GO: 0042625 |
| Divalent inorganic cation transmembrane transport activity | GO: 0072509 |
| Structural constituent of nuclear pore | GO: 0017056 |
| CC (Cellular Component) | |
| Golgi cisterna | GO: 0031985 |
| Over-expressed in non-melanic samples | |
| BP (Biological Process) | |
| Antigen processing via MHC class II | GO: 0002504 |
| Response to stress | GO: 0006950 |
| Sex differentiation | GO: 0007548 |
| Detection of abiotic stimulus | GO: 0009582 |
| Detection of stimulus | GO: 0051606 |
| Androgen receptor signaling pathway | GO: 0030521 |
| MF (Molecular Function) | |
| Wnt-protein binding | GO: 0017147 |
| Wnt-activated receptor activity | GO: 0042813 |
| Oxidoreductase activity | GO: various |
| Ubiquitin-specific protease activity | GO: 0004843 |
| CC (Cellular Component) | |
| SCF ubiquitin ligase complex | GO: 0019005 |

Our exome analysis has detected genes that are relatively over-expressed in either melanic or non-melanic individuals. Volumes of pharmacological, genetic and evolutionary literature has been dedicated to understanding the underlying genetic causes of colouration and other phenotypic attributes (i.e. Ducrest *et al.* 2008; Alho *et al.* 2010). Strong relationships between general phenotype and environmental conditions have been observed previously (Roulin 2016). While these interactions cannot be ruled out here, most of the insular *Podarcis* populations seem to be found in very similar habitats. Roulin and Ducrest (2013) identified five hypotheses to explain the existence of covariation between darker phenotypes and five other attributes: i) greater resistance to stress, ii) a reduced inflammatory response, iii) better regulation between food intake and energy expenditure, iv) more resistant to oxidative stress and v) greater sexual activity. Relative to greater resistance to stress our results show over-expression of stress-response genes involved in non-melanic individuals which does

not support hypothesis (i). In contrast, over-expression in non-melanic individuals of the antigen processing via MHC II gene and Wnt signalling genes (Wnt-protein binding and Wnt-activated receptor activity), that control the regeneration in some adult tissues, does support hypothesis (ii). Melanic individuals show evidence of a higher metabolic rate (more expression for regulation carbohydrate transport, ATPase activity and fat cell differentiation), which may support hypothesis (iii): regulation of food intake versus energy expenditure. Running counter to this, a previous study found a slightly lower mass-adjusted field metabolic rates in the melanic Aire population of *P. lilfordi* relative to a non-melanic population of the same species (Brown i Pérez-Mellado 1994), however this comparison was made during a single short time-frame which might not be representative. Finally, we did not detect differential expression of genes involved in resistance to oxidative stress (iv) or sexual activity (v). Thus our exome analysis is indicative of a higher metabolic rate in melanic individuals as well as an increased inflammatory response to exogenous antigens.

Conclusions

In summary, this study examines whether differential expression of genes could explain intraspecific variation in melanism within the two species of insular *Podarcis*. Expression of the *MC1R* gene was not found to be higher in our melanic phenotypes, indicating that other genes related to the melanogenic pathway might be involved. However, we did find differences in exome expression between melanic and non-melanic individuals. Despite some limitations our study has enhanced understanding of the transcriptome in lizards and potential differences in gene expression associated with melanism through detection of differences in expression of metabolic rate and inflammatory response associated genes. It represents a first step towards understanding the complex melanogenesis process and the evolutionary processes that have led to the occurrence of melanism within these species.

Acknowledgements

This work was financed by the research grant CGL2015-68139-C2-1-P of the Ministerio Español de Economía y Competitividad and European Regional Development Fund (ERDF). J.M.B. were funded by fellowships (FPI/1488/2012) from the Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats (Govern de les Illes Balears), co-financed by the European Social Fund. The Fieldwork on these protected species was authorized by the Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori, Govern de les Illes Balears (permit No. CEP 56/2013). This specifically authorized capture, release of lizards, and removal of a tail tip for DNA/RNA analysis. This procedure fell outside of the remits of the University of Salamanca/Balearic Islands ethics committees because specific permits were obtained from the competent authorities.

CAPÍTOL 2

FILOGEOGRAFIA D'ALGUNES ESPÈCIES DEL GÈNERE *PODARCIS*

Evolutionary history of *Podarcis tiliguerta* on Corsica and Sardinia

V. Rodríguez*, J. M. Buades*, R. P. Brown, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado, C.
Corti, M. Delaugerre, J. A. Castro, A. Picornell, M. M. Ramon

BMC Evolutionary Biology (2017) 17(1):27

* these authors contributed equally to this work



La filogeografia del gènere *Podarcis*, el gènere de rèptils més abundant i divers de tota la Mediterrània ha esta estudiada per diversos investigadors, però resten per resoldre problemes molt interessants. Per això aquest capítol es centra en el coneixement de la filogènia d'algunes espècies del gènere *Podarcis* com *P. tiliguerta* i *P. liolepis*. La majoria d'estudis realitzats es basen en la variació del genoma mitocondrial, donada la alta taxa d'evolució d'aquest marcador, el que el fa adequat per l'anàlisi de filogènies recents. En aquest capítol es pretén ampliar les anàlisis amb marcadors nuclears, que presentin elevades taxes de variació.

En un primer treball s'estudia l'espècie *P. tiliguerta*, de la qual es vol esbrinar si són una única espècie o és realment un complex d'espècies. Amb aquesta finalitat es mostrejaren l'illa de Còrsega i l'illa de Sardenya així com algunes de les illes i illots que es troben al seu voltant.

Es presenta també un segon estudi amb les dades preliminars de l'anàlisi de l'espècie de *Podarcis* que viu a l'arxipèlag de Columbretes, que actualment es suposa que es pot tractar de *P. liolepis*. Per analitzar la filogènia de l'espècie s'han agafat mostres de les distintes espècies que conformen el complex *P. hispanica* junt amb altres de *P. muralis*. Més concretament s'han obtingut els resultats de la variabilitat a gens nuclears d'un total de 82 mostres.

Evolutionary history of *Podarcis tiliguerta* on Corsica and Sardinia

#V. Rodríguez, #J. M. Buades, R. P. Brown, B. Terrasa, V. Pérez-Mellado, C. Corti, M. Delaugerre, J. A. Castro, A. Picornell, M. M. Ramon

these authors contributed equally to this work

Abstract

Podarcis tiliguerta is a wall lizard endemic to the Mediterranean islands of Corsica and Sardinia. Previous findings of high mtDNA and morphological diversity have led to the suggestion that it may represent a species complex. Here, we analysed mitochondrial and nuclear markers (mtDNA, 3110 bp; 6 nDNA loci, 3961 bp) in *P. tiliguerta* sampled from thirty-two localities across Corsica and Sardinia.

We find much greater intraspecific genetic divergence than between sister species of other Mediterranean island *Podarcis*, i.e., between *P. lilfordi* and *P. pityusensis*. We detected three mtDNA clusters in Corsica (North, South-East and South-West) and either two or three in Sardinia (North vs. South) depending on the clustering method. Only one or two nDNA groups were identified within each main island (again, depending on the method). A Bayesian time-calibrated multispecies coalescent tree was obtained from mtDNA and provided statistical support for a Miocene origin of the species (13.87 Ma, 95% HPD: 18.30-10.77 Ma). The posterior mean divergence time for the Corsican and Sardinian lineages was 12.75 Ma ago (95% HPD: 16.94-9.04 Ma).

The results support the evolutionary distinctiveness of Corsican and Sardinian populations and also indicate a lack of post-divergence migration despite periods of contact being possible. Further to this, species delimitation analyses of Corsican and Sardinian lineages provided statistical support for their recognition as distinct (sister) taxa. Our results provide new insights into the biogeography of the Mediterranean biodiversity hotspot, and contribute important findings relevant to the systematics and evolution of this speciose lizard genus.

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

Running title: Evolutionary situation of *Podarcis tiliguerta*



Introduction

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

The Mediterranean basin was one of the first 25 Global Biodiversity Hotspots to be named (Myers *et al.* 2000) and is characterized by substantial island diversity (Fernández-Palacios 2010). The Tyrrhenian region within the Mediterranean is particularly diverse due to the influence of complex paleogeographical and historical factors (Verlaque *et al.* 1997; Médail i Quézel 1999). It includes Sardinia and Corsica, two of the largest and highest (1834 m and 2710 m, respectively), Mediterranean Islands, which are separated by a strait of only 11 km. They contain high levels of endemism including several hundred endemic plants. Geological history has undoubtedly played a role in generating this diversity. A land bridge maintained the connection between the islands and Europe (Meulenkamp i Sissingh 2003) until their separation, completed 9 Ma ago (Álvarez 1972, 1974). This was subsequently lost although connections between the Corsica–Sardinia archipelago and Europe and North Africa were re-established through desiccation of the Mediterranean basin during the Messinian Salinity Crisis (MSC; 5.96-5.33 Ma) (Krijgsman *et al.* 1999; Duggen *et al.* 2003). Corsica and Sardinia have since been temporarily connected as a result of more minor changes in sea level during glacial periods in the Pleistocene, with the last contact being during the Last Glacial Maximum (LGM) (Grill *et al.* 2007).

The lizard genus *Podarcis* encompasses about 19 species and is widespread across the Mediterranean. *Podarcis tiliguerta* is endemic to Corsica and Sardinia. It exhibits a great intraspecific variability in morphological traits, especially colour pattern and melanism, the latter found within populations from small islands away from the main islands (Lanza 1972, 1976; Lanza i Brizzi 1974; Brizzi i Lanza 1975; Lanza i Poggesi 1986; Arnold i Ovenden 2002). This variation has led to the description of several microinsular subspecies (Lanza i Corti 1996; Corti i Lo Cascio 2002). Morphological (Bruschi *et al.* 2006, 2010) and genetic studies, based on both allozymes (Capula 1996) and mitochondrial sequences (Pinho *et al.* 2004; Harris *et al.* 2005; Podnar i Mayer 2005), have evidenced the existence of two or possibly three divergent genetic clusters within the Corsica-Sardinia archipelago. The underlying reasons for this divergence remain unexplained, but its magnitude has led some authors to suggest that *P. tiliguerta* might represent an insular species complex (Harris *et al.* 2005; Bruschi *et al.* 2006). Similar findings have been documented for other *Podarcis* from much wider geographic areas, e.g., *P. hispanica*, from the Iberian peninsula (Pinho *et al.* 2006) and *P. erhardii*, from Greece (Poulakakis *et al.* 2003). Objective coalescent-based statistical analyses of species delimitation may provide an important step towards robust

assignment of new taxonomic units based on genetic groups within the putative complex.

This study aims to provide the most detailed analysis of genetic variation of *P. tiliguerta* to date, using both mitochondrial (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA) markers. We use these data to reveal new insights into the patterns and causes of the genetic diversity. We examine two important aspects of the evolutionary history of *P. tiliguerta*, namely the number of lineages and timing of divergence between these lineages and from other *Podarcis*. In addition, we investigate the historical biogeography of *P. tiliguerta* in relation to known physical changes in the region.

Material and methods

Sampling

Forty-one *Podarcis tiliguerta* were captured under license from 15 localities in Corsica, 13 localities in Sardinia (in May 2011) and four offshore islands and islets (September 2012) by noosing, with the aim of covering the main geographical regions (**Figure 1** and **Table 1**). Tail-tips were removed and stored in 100% ethanol before releasing individuals at sites of capture.

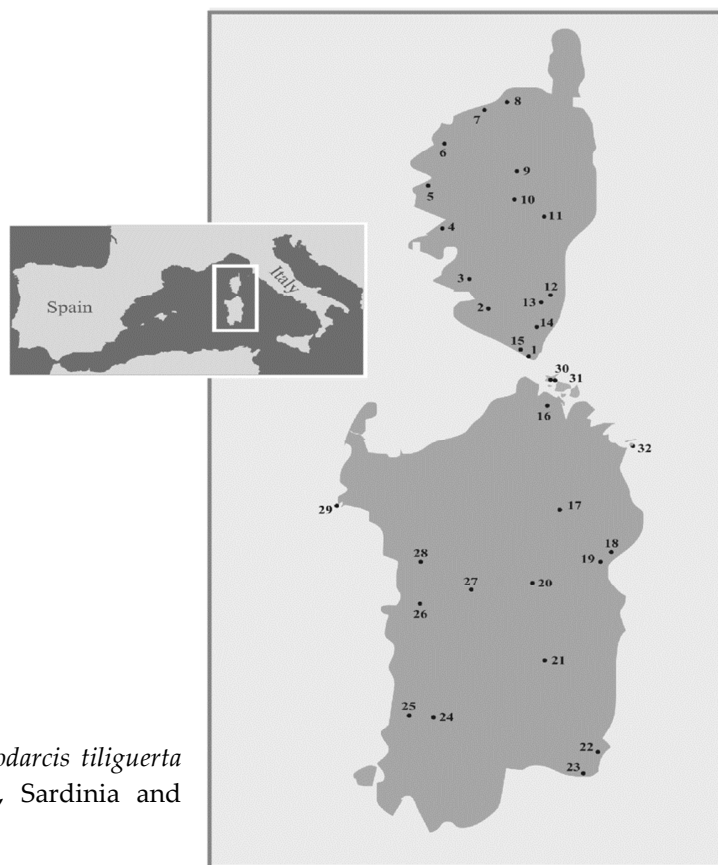


Figure 1. Sites at which *Podarcis tiliguerta* were sampled in Corsica, Sardinia and adjacent islands.

DNA Amplification and sequencing

A standard phenol-chloroform protocol was used for DNA extraction (Sambrook *et al.* 1989). Six non-overlapping mtDNA fragments were amplified and sequenced for each



specimen containing sequences from the following genes: i) partial 12S rRNA, ii) partial tRNA_{Glu} and partial cytochrome b (*Cytb*), iii) partial *Cytb* and partial tRNA_{Thr}, iv) partial control region (CR), v) two partial subunits of the NADH dehydrogenase gene and associated tRNAs (referred to as ND1, ND2, tRNA_{Ile}, tRNA_{Gln}, and tRNA_{Met}) and vi) partial 16S rRNA. Primers and amplification conditions are the same as those used in our previous studies of *Podarcis* (Terrasa *et al.* 2009; Rodríguez *et al.* 2013, 2014) (see **Additional File 1**), with the exception of the light strand primer (L14143; see **Additional File 1**) for amplification of fragment (ii) (above) in the Sardinian specimens. The 16S rRNA primers were obtained from Carranza *et al.* (1999).

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

| Localities | | Samples |
|-------------------------------------|---|----------|
| Corsica Island | | |
| 1 | Bonifacio | TCO1/17 |
| 2 | Sartène | TCO2 |
| 3 | Filitosa | TCO3 |
| 4 | Sant Bastiano (Calcatoggio) | TCO4 |
| 5 | Les Chalanches (Piana) | TCO5 |
| 6 | Casa Vecchia (Calvi) | TCO6 |
| 7 | L'Île Rousse | TCO7 |
| 8 | Pietra Moneta | TCO8 |
| 9 | Corte | TCO9/18 |
| 10 | Vivario | TCO10 |
| 11 | Ghisonaccia | TCO11/19 |
| 12 | Ribba (San Cavino Di Carbini) | TCO12 |
| 13 | Casteddu d'Araghju (Lecci) | TCO13 |
| 14 | Chera (Sotta) | TCO14 |
| 15 | La Trinité (Bonifacio) | TCO20/21 |
| Sardinia Island | | |
| 16 | Gallura | TSA3 |
| 17 | Romanzesu (Bitti Nuoro) | TSA1 |
| 18 | Dorgali (Nuoro) | TSA11 |
| 19 | Su Gologone (Oliena Nuoro) | TSA10 |
| 20 | Fonni | TSA5 |
| 21 | Flumendosa lake (Cagliari) | TSA13 |
| 22 | Costa Rei (Cagliari) | TSA19 |
| 23 | Villasimius (Cagliari) | TSA12/18 |
| 24 | Locanda dil Parco (foresta demaniale di Montimannu, Villacidro) | TSA15 |
| 25 | Fluminimaggiore | TSA20 |
| 26 | Narbolia (Oristano) | TSA17 |
| 27 | Nuraghe Sorradile (Oristano) | TSA2 |
| 28 | Nuraghe Nuradeo | TSA4 |
| Sardinian islands and islets | | |
| 29 | Foradada Island (Alghero Sassari) | Tf1-3 |
| 30 | Paduleddi islet (La Maddalena archipelago) | Tp1-3 |
| 31 | Stramanari islet (La Maddalena archipelago) | Ts1 |
| 32 | Molara Island | TSA8 |

Six partial nuclear genes were sequenced: i) melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*), ii) recombination-activating gene 1 (*RAG1*), iii) apolipoprotein B gene *APOBE28*, iv) lipoprotein gene *BLC9L*, v) transcription factor gene *KIAA2018* and vi) kinesin family member *KIF24*. Primers (Mayer i Pavlicev 2007; Portik *et al.* 2012; Buades *et al.* 2013) are described in **Additional File 1**.

Sequencing of both strands of PCR products was carried out on an automated ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using a BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and edited and aligned using BioEdit v.7.0.5.2. (Hall 1999).

Analyses of genetic variability and structuring

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

Relationships between nuclear DNA haplotypes were explored using statistical parsimony networks, with a 95% connection limit (program: TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000)).

Analysis of molecular variance (AMOVA) (program: Arlequin v.3.1.1 (Excoffier *et al.* 2005)) was used to examine genetic structuring between primary geographic groups (Corsica vs. Sardinia and Sardinian islands).

Bayesian phylogeographical and ecological clustering (BPEC) (Manolopoulou *et al.* 2011; Manolopoulou i Emerson 2012) was used to identify genetically distinct geographical population clusters in Corsica and Sardinia. BPEC relies on parsimony in order to reduce the number of candidate trees. Different haplotype trees and migration events are explored through the Markov chain Monte Carlo (MCMC) sampler. Migration events are assumed to occur when a haplotype (with or without a mutation from its parent haplotype) migrates to a new geographical cluster. Locations were specified as latitudes and longitudes recorded during fieldwork using a motion X-GPS HD V21.0 Build 1737R (Fullpower Technologies Inc.). For each run, a strict parsimony criterion was applied and the maximum number of migrations was 4. The MCMC chain was run for 10 million iterations with 20,000 steps saved. Separate analyses were performed on Corsica and Sardinia. A subsample of 1371 mtDNA sites were selected for this analysis due to high levels of mtDNA divergence (saturation of third codon positions and other regions were detected using an appropriate test (Xia *et al.* 2003; Xia i Lemey 2009). The analysed sequence comprised: 12S rRNA (359 bp), CR (465 bp) and *Cytb* codon positions 1 and 2 (548 bp). The geographical distributions of alleles were similarly analyzed for each nuclear locus, independently.

For comparison, an alternative genetic clustering procedure implemented within the program BAPS v.5.3 (Corander *et al.* 2003) was used to infer population structure without reference to geographical location. It was applied to all nuclear markers together, and to mtDNA alone. The number of clusters was determined and



admixture analyses were executed to infer the ancestral source of the samples (without priors on geographic location).

Species phylogeny, divergence times and species delimitation

The multispecies coalescent approach implemented in *BEAST v. 1.7.4 (Heled i Drummond 2010; Drummond *et al.* 2012); was used to estimate divergence times and phylogenetic relationship between specific mitochondrial lineages from the main islands, Corsica and Sardinia (with surrounding islets). The method allows estimation of divergence times while taking into account ancestral polymorphism. However, it often suffers from problems associated with prior specifications (Heled i Drummond 2012) and achieving good mixing of the MCMC chain (particularly when multiple loci are analysed). Also, the inclusion of several poorly informative nuclear markers could have a substantial and potentially undesirable impact on the estimated divergence times (Brown i Yang 2010). For these reasons, we included only mtDNA in the analysis.

Eight partitions were used to account for heterogeneity in sequence evolution and suitable models for each partition were identified using jModeltest v.0.1.1 (Posada 2008) (AICc criterion, i.e., Akaike Information Criterion corrected for small samples). We partitioned the sequence by grouping functionally similar sites from specific regions as they should have similar properties (rates in particular). These were: i) 12S rRNA, ii) CR, iii) all tRNAs, iv) 1st and 2nd codon positions of the ND1/ND2 sequences, v) 3rd codon position of ND1/ND2, vi) 1st codon position of *Cytb*, vii) 2nd codon position of *Cytb*, viii) 3rd codon position of *Cytb*. When the selected model was not available in *BEAST, we used the most similar available model.

We included mtDNA from all *P. tiliguerta* samples together with homologous sequences from two species that comprise a sister lineage to *P. tiliguerta*: *P. lilfordi* and *P. pityusensis* (Arnold *et al.* 2007). Inclusion of these taxa allowed incorporation of a time-calibrated node in the analysis (Brown *et al.* 2008; Rodríguez *et al.* 2013) (see **Additional File 2** for GenBank accession numbers). The age of the (*P. lilfordi*, *P. pityusensis*) node on the population was constrained using the normal distribution N (5.325, 0.0001), where 1 unit = 1Ma. The MSC is a well-known physical event in the Mediterranean and ended with very rapidly rising sea levels after the opening of the Mediterranean-Atlantic connection. Some studies have suggested that refilling of the basin may have only taken only a few thousand years (Krijgsman *et al.* 1999; Duggen *et al.* 2003; Pierre *et al.* 2006). This would have separated the Gymnesic and Pityusic Islands. Evidence from other studies (e.g., Martínez-Solano *et al.* 2004) indicates the suitability of narrow time constraints on (Gymnesic, Pityusic) nodes. Refilling has been dated at 5.33 Ma (Krijgsman *et al.* 1999) and given the deep intermediate channel between the island groups and the evidence of a very rapid refilling of the basin, the narrow normal distribution around a mean of 5.325 Ma would appear suitable.

A strict clock model was used in *BEAST (see Brown i Yang 2011), and the tree prior was specified by a Yule process. The MCMC chain was run for 300 million generations sampled every 10,000 steps. Tracer v. 1.5 (Rambaut i Drummond 2007) allowed visual inspection of marginal posteriors. TreeAnnotator (BEAST package) was

used to combine and analyse the posterior tree samples at stationarity (trees were combined using the maximum sum of clade credibilities criterion).

Species delimitation was examined using three different approaches. First the Bayesian Phylogenetics and Phylogeography program (BPP, v. 3.1) (Yang i Rannala 2010; Rannala i Yang 2013) was used to obtain posterior probabilities on specified nodes. BPP implements a reversible jump Markov chain Monte Carlo (rjMCMC) to search the parameter space that includes θ population divergence and gene trees. Analyses were performed with i) mtDNA, ii) nDNA and iii) all markers, to determine the impact of mtDNA polymorphism on species delimitation. Gamma distributions (G) with the following shape and different scale parameters were used to specify the population size, θ_s : G(1,10) τ_0 G(1,10), θ_s G(1,10) τ_0 G(1, 2000), θ_s G(1, 2000) τ_0 G(1, 10), θ_s G(1, 2000) τ_0 G(1, 2000). The MCMC chain was run for 400,000 steps (following a burnin of 20,000 steps), sampled every 20 steps. Each analysis was run three times to confirm consistency between runs.

Two additional approaches of species delimitation analysis suitable for single locus data (only mtDNA) were also tested. The Poisson Tree Processes model (PTP) (Zhang *et al.* 2013) uses non-ultrametric phylogenetic trees and directly incorporates the number of nucleotide substitution in the model of speciation using a Poisson distribution to describe the probability that a substitution gives rise to a speciation event. This method delimits species under the assumption that the number of substitutions between species is considerably higher than within species. The branch lengths of the input tree are supposed to be generated by two independent classes of Poisson events, one corresponding to speciation and the other to coalescence. A bPTP analysis (a recent version of the PTP that implements Bayesian support values to the delimited species) was conducted on the bPTP web server (<http://species.h-its.org/ptp/>). A phylogenetic tree inferred by IQ-Tree (Nguyen *et al.* 2015) was used as input. The chain was run for 150,000 MCMC generations, 10% of samples were discarded as burn-in and sampling interval was 100.

Finally GMYC (Pons *et al.* 2006; Fujisawa i Barraclough 2013), based on time-calibrated ultrametric phylogenetic trees and using differences in branching rates to infer species was applied. The input tree was generated in BEAST v1.8.2. (Drummond *et al.* 2012) and the specifications were the same as the ones described above for the *BEAST analysis (8 partitions, models, strict clock, time-calibration and tree prior/yule process). Independent MCMC runs of 76 million steps were sampled every 10,000 steps (10% of samples were removed as burn-in). The GMYC analysis was conducted using this consensus tree and the single-threshold method within the SPLITS package (Ezard *et al.* 2009) on R v 3.3.2 (Team 2016).



Results

Mitochondrial DNA

A total of 3110 bp of mtDNA sequence was obtained (12S rRNA 392 bp, control region 497 bp, ND1 85 bp, ND2 510 bp, cyt b 929 bp (two fragments), tRNAs 256 bp, 16S rRNA 431 bp). Sequences have been deposited in GenBank (for accession numbers see **Additional File 3**). The concatenated sequence contained 646 polymorphic sites, giving rise to 37 different haplotypes, which differed by a mean pairwise difference of 216.09 (± 92.03). Indices of mtDNA diversity (**Table 2**; analyses without 16S rRNA sequences) were higher in *P. tiliguerta* than corresponding values for related species (Terrasa *et al.* 2009; Rodríguez *et al.* 2013), while non-significant neutrality tests (Tajima 1989; Fu i Li 1993; Fu 1997; Fay i Wu 2000) supported neutral evolution.

Nuclear data

The nuclear loci analysed were: *MC1R* (720 bp), *RAG1* (939 bp), *APOBE28* (489 bp), *BLC9L* (627-636 bp), *KIAA2018* (644-659 bp) and *KIF24* (497-518 bp). Sequences have been deposited in GenBank (**Additional File 3**). Basic genetic diversity indices and neutrality statistical tests (Tajima 1989; Fu 1997) are indicated in **Table 3**. The phi test (Bruen *et al.* 2006) showed no statistically significant evidence for recombination in any gene: *MC1R* ($p = 0.164$), *APOBE28* ($p = 0.369$), *KIAA2018* ($p = 0.095$), *BLC9L* ($p = 0.467$), *KIF24* ($p = 0.322$), *RAG1* ($p = 0.193$).

Table 2. Diversity estimates for the concatenated mtDNA fragment in *P. tiliguerta* (without 16S rRNA sequences) compared with others species of the Western Islands Group (*P. lilfordi*, *P. pityusensis* and *P. filfolensis*). Parameters for Corsica and Sardinia *P. tiliguerta* were also estimated independently.

| Species | N | V | h | Nucleotide diversity | K | Fu's Fs (1997) | Fu and Li's D (1993) | Fu and Li's F (1993) | Fay and Wu's H (2000) | Tajima's D (1989) |
|---|-----|-----|----|----------------------|---------|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>P. lilfordi</i> ^a (2382 bp) | 117 | 189 | 62 | 0.019±0.005 | 45.067 | -1.129 ^{ns} | 0.652 ^{ns} | 0.860 ^{ns} | -17.572 ^{ns} | 0.770 ^{ns} |
| <i>P. pityusensis</i> ^b (2430 bp) | 73 | 90 | 60 | 0.004±0.001 | 9.083 | -56.983 ^{***} | -2.432 ^{**} | -2.589 ^{**} | -25.341 ^{**} | -1.745 [*] |
| <i>P. filfolensis</i> ^c (2533 bp) | 31 | 41 | 20 | 0.004±0.001 | 9.355 | -4.097 [*] | -0.681 ^{ns} | -0.668 ^{ns} | -12.409 ^{**} | -0.325 ^{ns} |
| <i>P. tiliguerta</i> (2681 bp) | 41 | 595 | 37 | 0.074±0.003 | 197.126 | 0.840 ^{ns} | 1.419 ^{ns} | 1.425 ^{ns} | -12.209 ^{ns} | 0.792 ^{ns} |
| Corsica | 19 | 394 | 19 | 0.046±0.006 | 122.07 | -1.030 ^{ns} | 0.858 ^{ns} | 0.671 ^{ns} | -77.263 ^{ns} | -0.043 ^{ns} |
| Sardinia | 22 | 386 | 18 | 0.051±0.009 | 137.36 | 4.241 ^{ns} | 1.510 ^{ns} | 1.569 ^{ns} | -52.468 ^{ns} | 0.859 ^{ns} |

N= number of individuals sampled; V= variable position; h= number of haplotypes; K= average number of pairwise differences.

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

a,b,c obtained from data in: a, Terrasa *et al.* (2009); b, Rodríguez *et al.* (2013); c, Rodríguez *et al.* (2014).



Table 3. Diversity estimates for six nuclear exons in *P. tiliguerta* (length polymorphisms are included in these analyses).

| Exon gene | Length (bp) | N ind. | V | N hap | Nucleotide diversity | K | Fu's Fs (1997) | Tajima D (1989) |
|-----------------------------|-------------|--------|-----|-------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|
| <i>MC1R</i> | 720 | 39 | 47 | 56 | 0.006±0.0003 | 4.076 | -0.133 ^{ns} | -0.064 ^{ns} |
| <i>RAG1</i> | 939 | 38 | 70 | 52 | 0.015±0.0004 | 6.045 | -0.424 ^{ns} | -0.086 ^{ns} |
| <i>APOBE28</i> | 489 | 37 | 47 | 41 | 0.006±0.0006 | 2.961 | -0.367 ^{ns} | -0.055 ^{ns} |
| <i>BLC9L</i> | 636 | 38 | 67 | 56 | 0.009±0.0006 | 5.544 | -0.139 ^{ns} | -0.052 ^{ns} |
| <i>KIAA2018</i> | 659 | 39 | 71 | 66 | 0.020±0.0006 | 13.000 | -0.262 ^{ns} | -0.039 ^{ns} |
| <i>KIF24</i> | 518 | 34 | 75 | 55 | 0.021±0.0008 | 10.449 | -0.491 ^{ns} | -0.078 ^{ns} |
| Concatenated | | | | | | | | |
| Corsica (n=38) | 3961 | | 225 | 38 | 0.010±0.006 | 37.516 | 0.288 ^{ns} | -0.083 ^{ns} |
| Sardinia (n=40) | 3961 | | 244 | 39 | 0.010±0.003 | 38.063 | 0.353 ^{ns} | -0.076 ^{ns} |
| <i>P. tiliguerta</i> (n=78) | 3961 | | 377 | 77 | 0.011±0.002 | 41.985 | 0.360 ^{ns} | -0.061 ^{ns} |

N ind.= number of individuals; V= number of variable position; N hap= number of haplotypes; K= average number of pairwise differences; n= number of sequences resulted of phased data; ^{ns} not significant, * P<0.05

Length polymorphisms were detected in three nuclear genes, including STRs (short tandem repeats) and INDELs (insertion-deletions). We briefly describe them here. The *KIAA2018* sequence contained a polymorphic microsatellite with a proline repeat (CCT) ranging from 4-9. The (CCT)₇ repeat was the most frequent (see **Additional File 4**). Only three individuals showed an amino acid change within this repeat. These were: i) two Sardinian samples TSA8 (CTT) and TSA18 (CYT) showed a leucine substitution in the fifth repeat, and ii) the Corsica sample TCO9 showed eight repeats with a threonine substitution in the final repeat. An STR was also observed within the *BLC9L* sequence with a variable number of repeats for glutamine and proline. The common structure was (Gln)₃₋₄ (Pro)₅₋₇ (Gln)₅ with the unique exception of a Corsican sample (TCO2) that showed an histidine: (Gln)₄ (Pro)₅ (His) (Gln)₅. Three different INDELs were detected in *KIF24* sequences: i) a 9 bp deletion (CATTTTGGT) in specimen TSA5 and ii) a 12 bp insertion (AAGGACTTTGGG) in TSA1-3, TSA5, TSA13 and Tf1-2, iii) 6 bp deletions (GAAAGC) in TCO6 and TCO10; and (AGAAAG) in TCO9. Note that i) and ii) occurred only in Sardinia, while iii) occurred only in Corsica.

Genetic structure of the insular populations

The mtDNA variance was partitioned as 51.01 % (i.e., $F_{ST}=0.51$) between Corsica and Sardinia (and offshore islands) and the remaining variance within these regions (AMOVA analysis). BAPS analysis of the mtDNA locus defined five genetic clusters ($\ln L=-8303.607$) (**Figure 2A**). The analysis distinguishes three Corsican groups: i) cluster A includes lizards from the south-western region (TCO2-4), ii) cluster B includes lizards from the south-east (TCO1, 12-14, 17, 20-21) and iii) cluster C includes lizards from the north of Corsica (TCO5-11, 18-19). Two Sardinian clusters are identified: cluster D includes specimens corresponding to localities in the south of the island (TSA12-13, 15, 18-20) and cluster E contains *P. tiliguerta* from Sardinian islands and islets (Molara Island, Foradada Island, Paduleddi Islet and Stramanari Islet) and from the north of the main island (TSA1-5, 10-11, 17).

AMOVA of the nuclear loci indicated that 18.2 % (i.e., $F_{ST}= 0.182$) of the variance occurred between Corsica and Sardinia (and offshore islands) with most of the variance being within these regions. Only two genetic clusters were defined by a BAPS analysis of concatenated nDNA ($\ln L= -5640.911$). The first included all Corsican individuals, and the second included Sardinian and individuals from small islet populations (**Figure 2B**). The TCS analysis indicated that two loci (*APOBE28* and *MC1R*) show star-like parsimony networks, with a main haplotype shared by Corsican and Sardinian samples, and derived haplotypes belonging to both islands (**Figure 3**). In contrast, *RAG1* and *BLC9L* show compound star-like networks consisting of two central haplotypes, corresponding to Corsica and Sardinia, separated by one mutational step. Finally, the two other networks (*KIF24* and *KIAA2018*) exhibit a clear separation between Corsican and Sardinian samples, together with a much higher differentiation between haplotypes (30 mutational steps). The *KIAA2018* sequences show greatest diversity of all nuclear loci analysed, characterised by 66 different haplotypes.

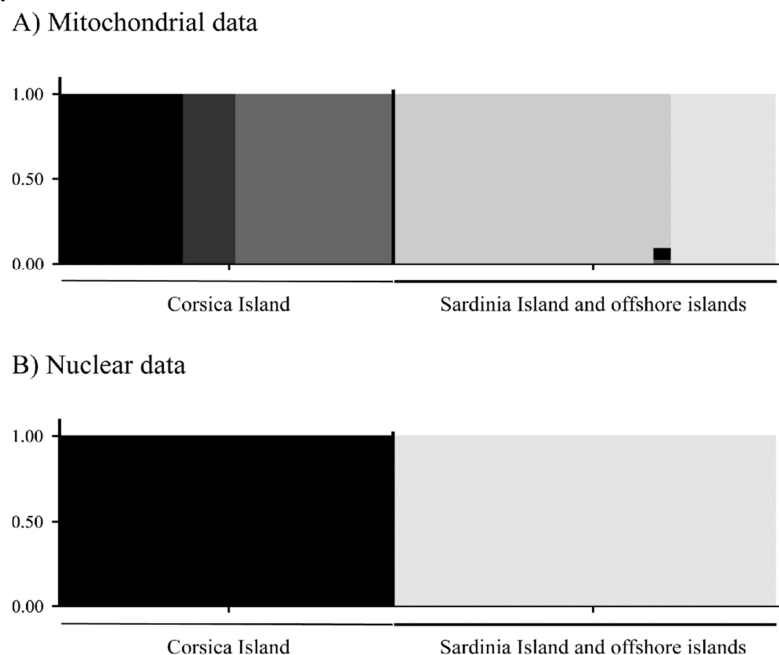


Figure 2. Overall genetic structure inferred from A) mtDNA and B) concatenated nuclear loci across the two main geographic regions used in this study. Mixture analyses were estimated by BAPS software. In the bar plot, vertical bars represent individuals and proportions of admixture, with colours corresponding to ancestral sources.

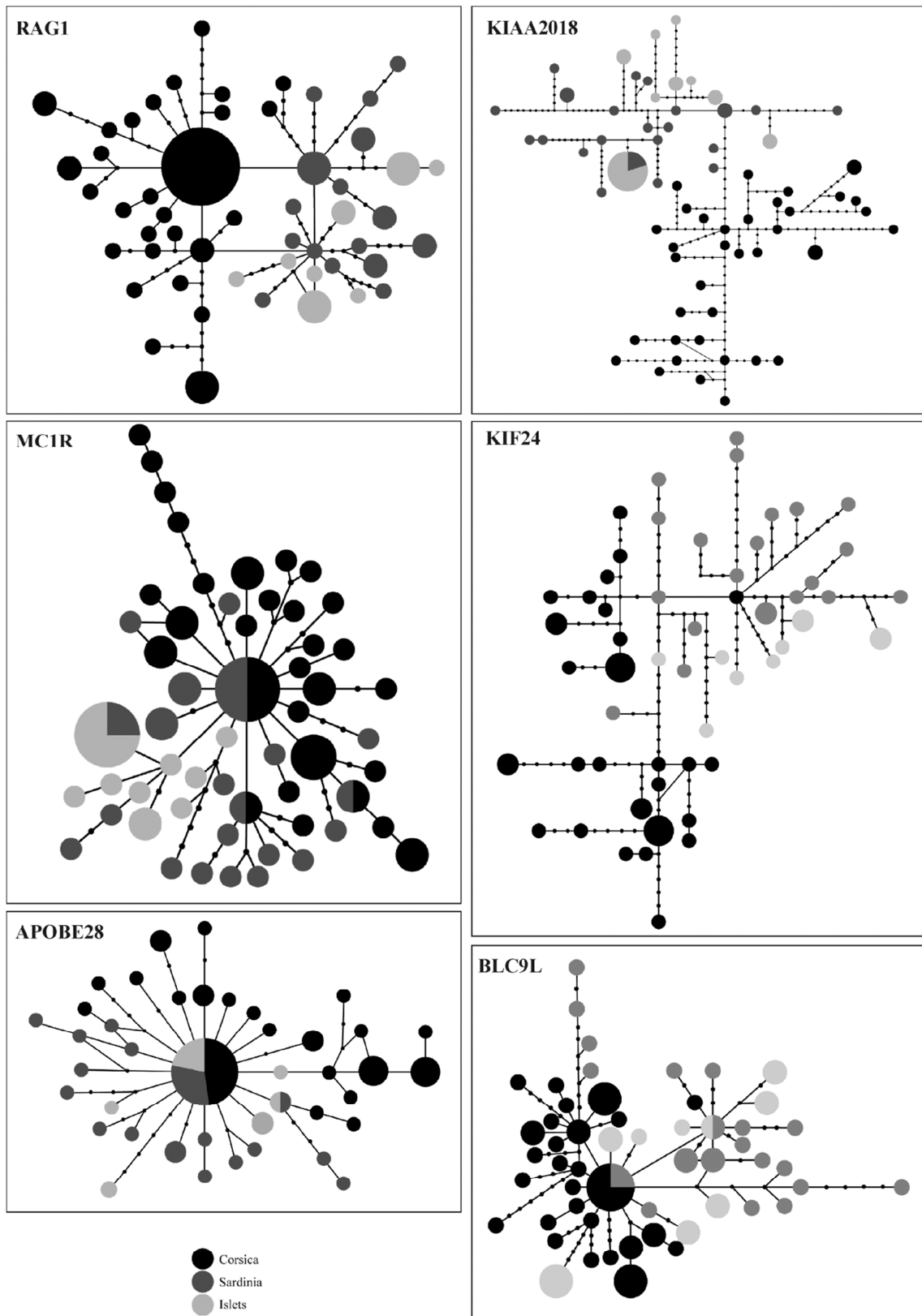


Figure 3. Nuclear haplotype networks for *Podarcis tiliguerta*.

Mitochondrial haplotypes from Sardinia were assigned by BPEC to three phylogeographic clusters with high posterior probabilities (>0.7) (**Figure 4A**), with most likely ancestral locations being Gallura, Villasimius and Costa rei (see **Figure 1** and **Table 1**). Three clusters were also obtained for Corsica (**Figure 4A**) with likely ancestral locations being Sant Bastiano, Corte and Vivario (see **Figure 1** and **Table 1**). Low posterior cluster assignment probabilities were obtained for eight Corsican haplotypes (~0.4-0.5), and one Sardinian (~0.5) haplotype. Geographical structuring in Corsica corresponded to the north, south-east and south-west of the island, while in Sardinia three geographical groupings were detected: i) north (with some offshore islands), ii) south and iii) Foradada Island (**Figure 4A**). BPEC analyses of nuclear loci assigned haplotypes to four phylogeographic clusters with generally high posterior probabilities: two of them, in Corsica and two, in Sardinia (**Figure 4B**). However all nuclear genes divide the main islands into northern and southern regions.

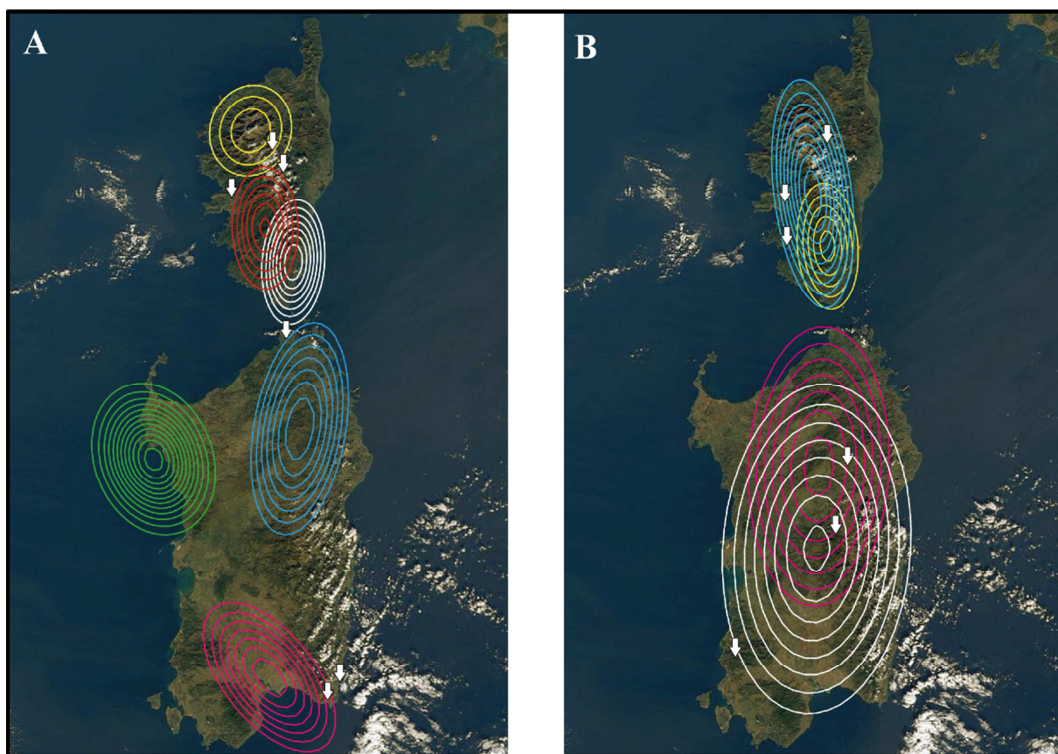


Figure 4. Analyses of Bayesian phylogeographical and ecological clustering (BPEC): A) using mtDNA or B) *RAG1* as example of nuclear DNA. Each coloured contour plot indicates a different phylogeographical clusters. The contour plots are centred at the ‘centre’ of each population cluster, and the coloured regions show the radius of 50% concentration contours around it. White arrows show the ancestral locations with the highest posterior probability for each island.

Species phylogeny, divergence times and species delimitation

Preliminary gene tree analyses were performed on all individual loci prior to the Bayesian multispecies coalescent analysis. These analyses ruled out the possibility that *P. tiliguerta* was polyphyletic relative to the other closely related taxa that were included (*P. hipanica*, *P. guadarramae*, *P. virescens*, *P. liolepis*, *P. lilfordi*, *P. pityusensis*, and *P. filfolensis*) (data not shown).

The species tree (**Figure 5**), based on mtDNA, provided a posterior mean for the divergence of *P. tiliguerta* from (*P. lilfordi*, *P. pityusensis*) at 13.87 Ma (95% highest posterior density, HPD: 18.30-10.77 Ma), and that for the divergence of Corsica and Sardinia lineages, at 12.75 Ma (95% HPD: 16.94-9.04).

All BPP analyses supported the two species (Corsica, Sardinia) model (P=1.00) irrespective of the prior specifications for θ_s and τ_0 and whether mtDNA was included or excluded from the analyses.

The trees obtained from the bPTP analysis (PTP-ML and PTP-sh) (excluding outgroups) showed 11 groups with high posterior probabilities (≥ 0.91). Of the 11 clusters, 8 comprised only 1 sample. The GMYC approach detected 9 clusters within *P. tiliguerta* with a total of 19 entities, excluding outgroups and with posterior probabilities ≥ 0.85 . The different clusters detected by these two analyses corresponded to different clades detected within Corsica and Sardinian islands, but none of these groups comprised both Corsica and Sardinian individuals, further supporting species delimitation of these two island forms. Additional information about PTP and GMYC analyses is available on request.

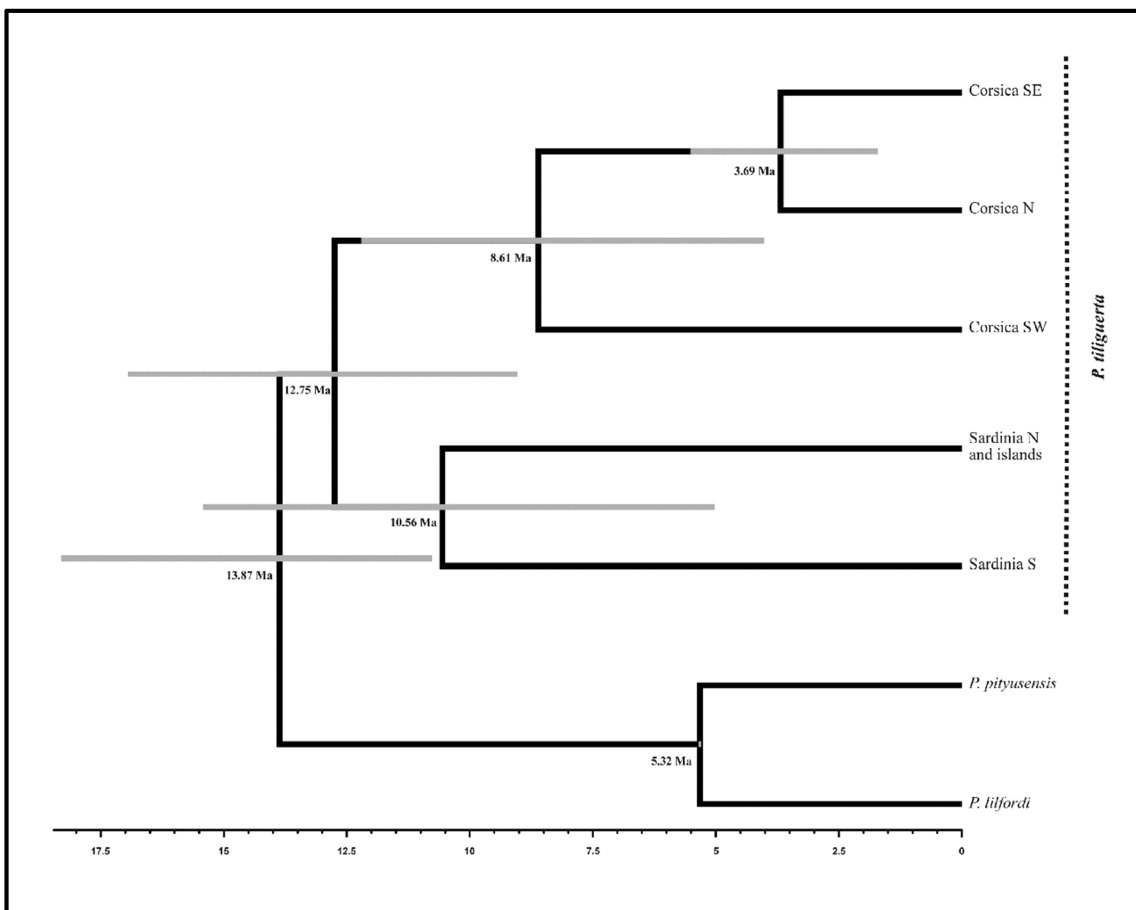


Figure 5. Mitochondrial populations tree chronogram estimated by *BEAST in *P. tiliguerta*. *P. lilfordi* and *P. pityusensis* are used as outgroups. Grey bars correspond to the 95% highest posterior density intervals for each divergence time.

Discussion

The most striking finding is the high degree of genetic variability detected within the taxon *Podarcis tiliguerta*. This has already been suggested by two previous studies that analysed protein mobility and mtDNA (Capula 1996; Harris *et al.* 2005). Other insular Mediterranean species, such as *P. pityusensis*, *P. lilfordi* or *P. filfolensis* show lower levels of divergence, although they inhabit smaller islands. For example, the mean pairwise differences for comparable mtDNA regions is more than four times higher than in *P. lilfordi*, and is almost 22 times greater than in *P. filfolensis* or *P. pityusensis*. In addition, intraspecific nDNA variability also appears to be greater *P. tiliguerta* than in other *Podarcis* which confirms the extreme genetic diversity observed within this species (Harris *et al.* 2005; Vasconcelos *et al.* 2006).

The high diversity is primarily accounted for by strong geographical structuring with a deep, ancient divergence between Corsican and Sardinia lineages as well as substantial within-island divergence. Early analyses of allozymes and short mtDNA fragments indicated two genetic groupings: Corsica and Sardinia (Capula 1996; Harris *et al.* 2005). Subsequent analyses, with wider sampling, revealed three mtDNA groups: two in Sardinia and one in Corsica (Podnar i Mayer 2005; Vasconcelos *et al.* 2006). Here, we detect three geographically-structured mtDNA groups within Corsica, corresponding to the north, south-east and south-west of the island. We also detect two/three (depending on the analysis) spatial groupings of mtDNA within Sardinia: one of which corresponds to the north of the main island and associated smaller islands, while the other corresponds to the south.

As expected, the nuclear data detected fewer clusters. The BAPS analyses revealed two groups: Corsica and Sardinia, while the slightly more sensitive BPEC analyses revealed two additional clusters within each island. Bruschi *et al.* (2006) studied *P. tiliguerta* using morphological characters and suggested hybridization was occurring in southern Corsican populations due to introductions of individuals from Sardinia which might contribute to these patterns. However, our nuclear and mtDNA analyses found no evidence of this. Although some nuclear alleles were shared between Corsican and Sardinian populations, the lack of any such patterns in the mtDNA suggests that incomplete lineage sorting is the most likely cause.

The ancestral species node for *P. tiliguerta* was dated at 12.75 Ma (Fig 5; 95% HPD: 16.94-9.04 Ma) confirming preliminary divergence time estimates (13 Ma) (Oliverio *et al.* 1998). *P. pityusensis* and *P. lilfordi* are related species to *P. tiliguerta*, including all them in the named “Western Islands group” (Harris i Arnold 1999). This clearly predates the intraspecific divergence within: i) *P. lilfordi* which dates to the early Pleistocene (Brown *et al.* 2008), ii) *P. filfolensis* which also diverged in the Pleistocene (Rodríguez *et al.* 2014) and iii) *P. pityusensis* which diverged in the mid-late Pleistocene (Rodríguez *et al.* 2013). The divergence time between Corsica and Sardinia far exceeds the usual limits for distinct species within the Squamata (Hasbun *et al.* 2005; Pinho *et al.* 2007). Reciprocal monophyly between the islands was found for several loci, which supports our detection of species delimitation (although not for all loci, as would be



expected between distinct species). This, and the general concordance with and among nuclear markers, explains why our species delimitation analysis provides such strong support for separation of *P. tiliguerta* into two species. In a future study we intend to provide formal (morphological and ecological) descriptions of these new taxa.

P. tiliguerta appears to have originated by allopatric speciation, from continental ancestors that colonized the Corsica-Sardinia microplate. According to Arnold *et al.* (2007), the Lacertini spread and diversified around 16-12 Ma BP (before present) producing the ancestors of the present genera, so genus origin postdates the isolation of the Corsica-Sardinia microplate from the Iberian plate (29 Ma). This indicates that the ancestors reached it subsequently via the land bridge that it maintained with the continent during its rotation. Later, the microplate split into two islands (15-9 Ma ago (Álvarez 1972, 1974)) leading to isolation of the Sardinian and Corsican lineages, concordant with our divergence time estimate. Since separation, the heterogeneous orography of Corsica and Sardinia could have played an important role in determining intraspecific diversity.

Conclusions

In summary, we analysed mtDNA and nuclear markers in *P. tiliguerta* and found high genetic variability and a deep genetic structure, corresponding to deep Miocene divergence between Corsica and Sardinia. In addition, we detected substantial within-island divergence but were unable to relate it to any geological or other events in the islands past. This study will motivate and contribute evidence to a taxonomic reassessment of *P. tiliguerta* with respect to the Corsican and Sardinian forms.

Additional File 1. Primers sequences used in amplification and sequencing.

| Primer | Sequence | Reference |
|---------------------------|--|---|
| 12s rRNA | | |
| L1091 | 5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3' | |
| H1478 | 5'- TGA CTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3' | Kocher <i>et al.</i> (1989) |
| Control region | | |
| L15022 | 5'-TACCCTTGCTCATAGCATAACTG-3' | |
| H00292 | 5'-GTCTTGTTGACTGTAATTAACCGATA-3' | Terrasa <i>et al.</i> (2009) |
| ND1-ND2 | | |
| L4178 | 5'-CARCTWATACACYTACTATGAAA-3' | |
| H4980 | 5'-ATTTTTCGTAGTTGGGTTTGRTT-3' | Macey <i>et al.</i> (1998) |
| Cytochrome b (ii) | | |
| L14724 | 5'-TGACTTGAARAACAYCGTTG-3' | |
| H15175 | 5'- CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' | Palumbi (1996) |
| L14143 | 5'-CGTTGTATTCAA CTATTA AAAAY-3' | This paper |
| Cytochrome b (iii) | | |
| L15347 | 5'-CATGAAACTGGATCAAACAACCC-3' | |
| H15915 | 5'- GTCTTCAGTTTTTGGTTTACAAGAC-3' | Fu (2000) |
| 16S rRNA | | |
| 16SL1 F | 5'-CCGTGCAAAGGTAGCATAATCAC-3' | |
| 16SH1 R | 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT -3' | Carranza <i>et al.</i> (1999) |
| RAG1 | | |
| RAG-R1 | 5'-AAAATCTGCCTTCCTGTTATTG-3' | |
| RAG-fo | 5'-GAAAAGGGCTACATCCTGG-3' | Mayer i Pavlicev (2007) |
| RAG-re | 5'-CCAGTTATTGCTTTTACAGTTC-3' | |
| MC1R | | |
| MC1R-PF | 5'GGCNGCCATYGTCAANAACCGGAACC-3' | |
| MC1R-PR | 5'CTCCGRAAGGCRTAAATNATGGGGTCCAC-3' | Buades <i>et al.</i> (2013) |
| APOBE28 | | |
| F1 | 5'-TGCGGGAGGAATAYTTTGA-3' | Portik <i>et al.</i> (2012) with little modifications |
| R1 | 5'-TCTATTCTRAGTCTCCTTSRCGAA-3' | |
| BLC9L | | |
| F1 | 5'-TGGATCCAKCCATGTTTGCTGGG-3' | Portik <i>et al.</i> (2012) with little modifications |
| R1 | 5'-GGCGTCTGCGGGGACTTGAG-3' | |
| KIAA2018 | | |
| F1 | 5'-CCCATCCYTACCTATGCAGCCATTA-3' | Portik <i>et al.</i> (2012) with little modifications |
| R1 | 5'-TGCCAGCCATTTGTGATATGCTYTGA-3' | |
| KIF24 | | |
| F1 | 5'-AAACGTRTCTCCMAAACGCATCC-3' | Portik <i>et al.</i> (2012) with little modifications |
| R1 | 5'-GGCTGCTGRAAYTGCTGGTG-3' | |



Additional File 2. *Podarcis spp* analysed as outgroup in *BEAST analyses.

| Species | Sampled Localities | GenBank Accession Numbers* |
|-----------------------|--|---|
| <i>P. lilfordi</i> | Balearic Islands (see Brown <i>et al.</i> (2008) for locality details) | mtDNA: EF694760–62, EF694764–66, EF694771, EF694773–75, EF694782, EF694785, EF694787–88, EF694799, EU006728, EU006730, EU006734, EU006738, EU006743, EU006745, EU006753, EU006756, EF694797, EF694799, EF694802, EF694805, EF694807, EF694809–10, EF990517, EF990522, EF990525, EF990531, EF990536, EF990540–41, EF990545–46, KC623944 |
| <i>P. pityusensis</i> | Balearic Islands (see Rodríguez <i>et al.</i> (2013) for locality details) | mtDNA: EF694768–69, EF694794–95, EU006725–26, EF694814–16, EF990552, EF694827–28, JX852045–JX852108, JX852118–JX852137 |

*Sequences obtained from Brown *et al.* (2008), Rodríguez *et al.* (2013), Terrasa *et al.* (2009) and this paper.

Additional File 3. Sample accession numbers for mitochondrial and nuclear gene.

| Specimen | 12 S rRNA | Control Region | ND1-ND2 | Cytochrome b | 16S rRNA | RAG1 | MC1R | APOBE28 | BLC9L | KIAA2018 | KIF24 |
|----------|-----------|----------------|---------|--------------|----------|----------|----------|----------|-------------|-------------|------------|
| TCO1 | KM58868 | KM58849 | KM58818 | KM58783 | KM58760 | KX237326 | KX237290 | KX237364 | KX237401 | KX237444 | KX237247 |
| TCO2 | KM58869 | KM58850 | KM58819 | KM58784 | KM58761 | KX237327 | KX237291 | KX237365 | KX237402 | KX237445-6 | KX237248 |
| TCO3 | KM58870 | KM58851 | KM58820 | KM58785 | KM58762 | KX237328 | KX237292 | KX237366 | KX237403-4 | KX237447-8 | KX237249 |
| TCO4 | KM58871 | KM58852 | KM58821 | KM58786 | KM58763 | KX237329 | KX237293 | KX237367 | KX237405 | KX237449-50 | KX237250 |
| TCO5 | KM58872 | KM58853 | KM58822 | KM58787 | KM58764 | KX237330 | KX237294 | KX237368 | KX237406 | KX237451-2 | KX237251 |
| TCO6 | KM58872 | KM58854 | KM58823 | KM58788 | KM58764 | KX237331 | KX237295 | KX237369 | KX237407 | KX237453-4 | KX237252-3 |
| TCO7 | KM58873 | KM58855 | KM58824 | KM58789 | KM58765 | KX237332 | KX237296 | KX237370 | KX237408 | KX237455-6 | KX237254 |
| TCO8 | KM58874 | KM58855 | KM58825 | KM58790 | KM58766 | KX237333 | KX237297 | KX237371 | KX237409-10 | KX237457-8 | KX237255 |
| TCO9 | KM58875 | KM58856 | KM58826 | KM58791 | KM58767 | KX237334 | KX237298 | KX237372 | KX237411 | KX237459 | KX237256 |
| TCO10 | KM58876 | KM58857 | KM58827 | KM58792 | KM58768 | KX237335 | KX237299 | KX237373 | KX237412 | KX237460-1 | KX237257-8 |
| TCO11 | KM58877 | KM58858 | KM58828 | KM58793 | KM58768 | KX237336 | KX237300 | KX237374 | KX237413 | KX237462-3 | KX237259 |
| TCO12 | KM58868 | KM58859 | KM58829 | KM58794 | KM58769 | KX237337 | KX237301 | KX237375 | KX237414 | KX237464-5 | KX237260 |
| TCO13 | KM58878 | KM58859 | KM58829 | KM58795 | KM58769 | KX237338 | KX237302 | KX237376 | KX237415 | KX237466-7 | KX237261 |
| TCO14 | KM58868 | KM58859 | KM58829 | KM58796 | KM58782 | KX237339 | KX237303 | KX237377 | KX237416 | KX237468-9 | KX237262 |
| TCO17 | KM58868 | KM58860 | KM58830 | KM58797 | KM58770 | KX237340 | KX237304 | KX237378 | KX237417 | KX237470-1 | KX237263 |
| TCO18 | KM58879 | KM58856 | KM58831 | KM58798 | KM58771 | KX237341 | KX237305 | KX237379 | KX237418 | KX237472 | - |
| TCO19 | KM58877 | KM58861 | KM58828 | KM58799 | KM58768 | KX237342 | KX237306 | KX237380 | KX237419 | KX237473 | - |
| TCO20 | KM58868 | KM58849 | KM58818 | KM58800 | KM58769 | KX237343 | KX237307 | KX237381 | KX237420 | KX237474-5 | KX237264 |
| TCO21 | KM58868 | KM58860 | KM58832 | KM58815 | KM58770 | KX237344 | KX237308 | KX237382 | KX237421 | KX237476-7 | KX237265 |
| TSA1 | KM58880 | KM58862 | KM58833 | KM58801 | KM58772 | KX237345 | KX237309 | KX237383 | KX237422 | KX237478-9 | KX237266-7 |
| TSA2 | KM58881 | JX852111 | KM58834 | KM58802 | KM58773 | KX237346 | KX237310 | KX237384 | KX237423-4 | KX237480 | KX237268-9 |
| TSA3 | KM58880 | KM58862 | KM58835 | KM58803 | KM58772 | KX237347 | KX237311 | KX237385 | KX237425-6 | KX237481-2 | KX237270-1 |
| TSA4 | KM58881 | JX852111 | KM58836 | KM58804 | KM58773 | KX237348 | KX237312 | KX237386 | - | KX237483-4 | KX237272 |
| TSA5 | KM58882 | JX852111 | KM58837 | KM58805 | KM58774 | KX237349 | KX237313 | KX237387 | KX237427 | KX237485 | KX237273-4 |
| TSA8 | KM58880 | KM58867 | - | KM58813 | KM58775 | KX237357 | KX237314 | KX237388 | KX237436 | KX237497 | - |
| TSA10 | KM58881 | JX852111 | KM58838 | KM58806 | - | - | - | - | - | - | - |
| TSA11 | KM58883 | KM58863 | KM58839 | KM58807 | - | - | - | - | - | - | - |
| TSA12 | KM58884 | KM58864 | KM58840 | KM58808 | KM58776 | KX237350 | KX237315 | KX237389 | KX237428 | KX237486-7 | KX237275 |
| TSA13 | KM58886 | KM58864 | KM58841 | KM58809 | - | KX237351 | KX237316 | KX237390 | KX237429 | KX237488-9 | KX237276-7 |
| TSA15 | KM58885 | KM58865 | KM58842 | KM58810 | KM58777 | KX237352 | KX237317 | KX237391 | KX237430 | KX237490 | KX237278 |
| TSA17 | KM58881 | JX852111 | KM58834 | KM58802 | - | KX237353 | KX237318 | KX237392 | KX237431-2 | KX237491 | KX237279 |
| TSA18 | KM58884 | KM58864 | KM58843 | KM58811 | KM58776 | KX237354 | KX237319 | KX237393 | KX237433 | KX237492-3 | KX237280 |
| TSA19 | KM58884 | KM58864 | KM58843 | KM58811 | KM58776 | KX237355 | KX237320 | KX237394 | KX237434 | KX237494-5 | - |
| TSA20 | KM58885 | KM58866 | KM58844 | KM58812 | KM58778 | KX237356 | KX237321 | KX237395 | KX237435 | KX237496 | KX237281 |
| Tp1 | JX852117 | JX852111 | KM58847 | KM58817 | KM58779 | KX237358 | JX126692 | KX237397 | KX237441 | KX237498 | KX237287 |
| Tp2 | JX852117 | JX852111 | KM58847 | KM58817 | KM58779 | KX237359 | KX237322 | KX237398 | KX237442 | KX237499 | KX237288 |
| Tp3 | JX852117 | JX852111 | KM58847 | KM58817 | KM58779 | KX237360 | KX237323 | KX237399 | KX237443 | KX237500 | - |
| Tf1 | JX852116 | JX852110 | KM58845 | KM58816 | KM58781 | KX237361 | KX237324 | - | KX237437 | KX237502 | KX237282-3 |
| Tf2 | JX852116 | JX852110 | KM58846 | KM58814 | KM58781 | KX237362 | JX126691 | KX237400 | KX237438 | KX237503 | KX237284-5 |
| Tf3 | JX852116 | JX852110 | KM58845 | KM58814 | KM58781 | - | KX237325 | - | KX237439 | KX237504 | KX237286 |
| Ts1 | JX852117 | JX852111 | KM58848 | KM58817 | KM58780 | KX237363 | JX126693 | KX237396 | KX237440 | KX237501 | KX237289 |



Additional File 4. STRs observed in *KIAA2018* gene (664 bp) included a proline repeat (CCT motif). The number of repeats ranged 4 to 9 (12 bp to 27 bp).

| Sample | Genotype | Sample | Genotype |
|-------------------------------------|----------|-----------------------|----------|
| Sardinia Island | | Corsica Island | |
| TSA1 | 6-9 | TCO1 | 6-6 |
| TSA2 | 6-6 | TCO2 | 7-8 |
| TSA3 | 7-9 | TCO3 | 6-8 |
| TSA4 | 7-9 | TCO4 | 6-9 |
| TSA5 | 7-7 | TCO5 | 4-7 |
| TSA12 | 6-9 | TCO6 | 6-7 |
| TSA13 | 6-9 | TCO7 | 5-7 |
| TSA15 | 6-6 | TCO8 | 5-8 |
| TSA17 | 7-7 | TCO9 | 8-8 |
| TSA18 | 7-9 | TCO10 | 7-9 |
| TSA19 | 6-9 | TCO11 | 7-8 |
| TSA20 | 6-6 | TCO12 | 5-6 |
| Sardinian islands and islets | | TCO13 | 6-7 |
| TSA8 | 9-9 | TCO14 | 5-7 |
| Tp1 | 7-7 | TCO17 | 5-7 |
| Tp2 | 7-7 | TCO18 | 7-7 |
| Tp3 | 7-7 | TCO19 | 7-7 |
| Ts1 | 8-8 | TCO20 | 6-8 |
| Tf1 | 8-8 | TCO21 | 4-8 |
| Tf2 | 9-9 | | |
| Tf3 | 8-8 | | |

Declarations

Funding

This work was financed by the research grant CGL2015-68139-C2-1-P of the Ministerio Español de Economía y Competitividad and European Regional Development Fund (ERDF). VR (FPI/2009) and JMB (FPI/1488/2012) were funded by fellowships (FPI/1488/2012) from the Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats (Govern de les Illes Balears), co-financed by the European Social Fund.

Availability of data and materials

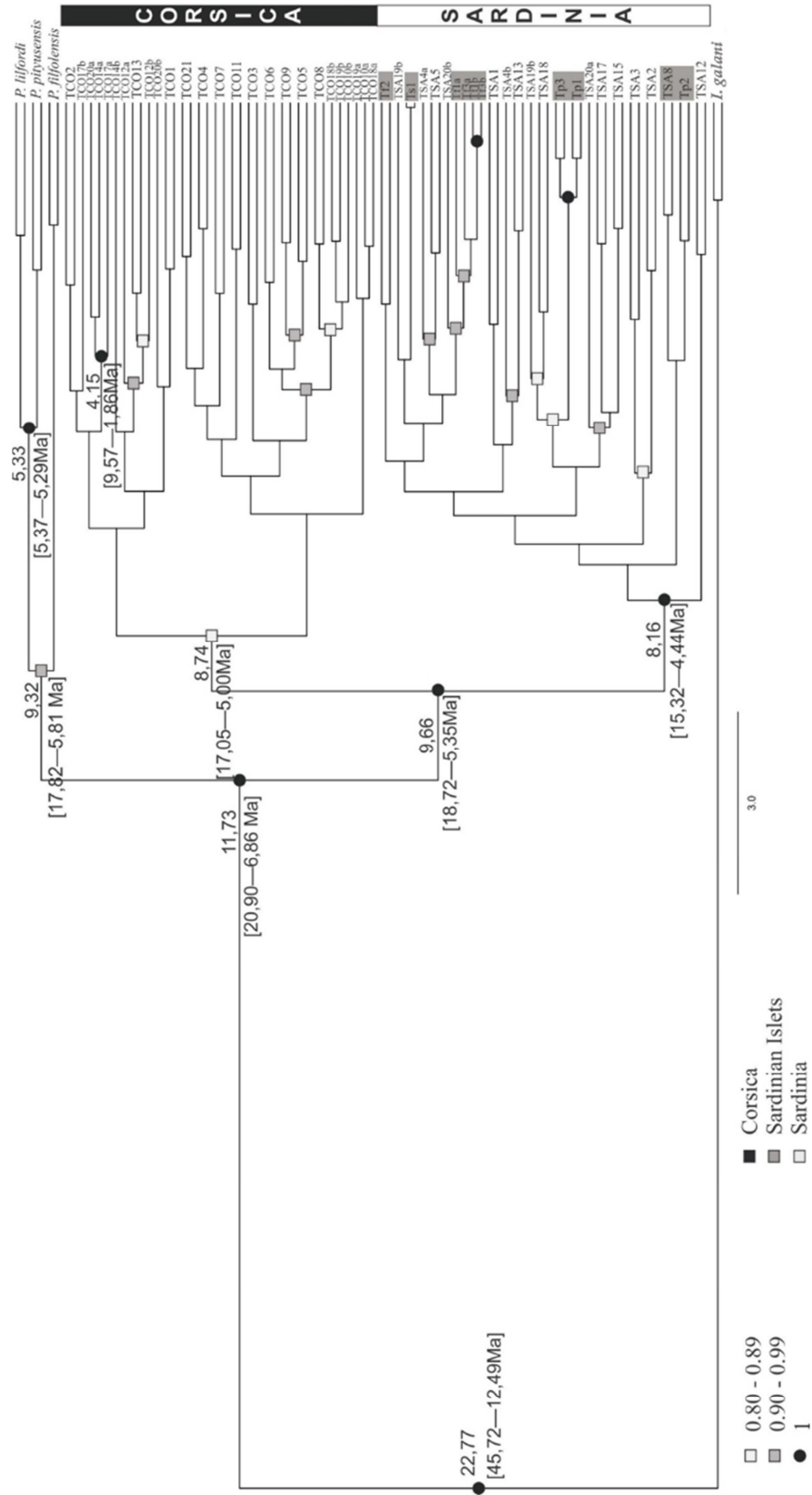
DNA sequences: GenBank Accessions numbers of the mtDNA (KM058760-KM058886) and from the nDNA (KX237247–KX237504, JX126691–93).

Acknowledgements

Our acknowledgement to CERFA for the license for field work in May 2011 (permit No. 13616*01) and the Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, that authorized sampling of lizards in Sardinia (authorization DPN-2010-0017564). We thank M. Bassitta and C. Colom for 16S rRNA amplification and sequencing.

Additional information not included in the publication

Additional Figure 1. *P. tiliguerta* tree using concatenated nuclear genes and estimated with *BEAST. *P. lilfordi*, *P. pityusensis*, *P. filfolensis* and *I. galani* were used as outgroups.



Preliminary results of the phylogenetic analysis of the Columbretes archipelago

Introduction

Columbretes archipelago consists of a group of small islets located in the Mediterranean Sea being their area of approximately 19 ha (Castilla *et al.* 2005). These uninhabited islets are relatively close to Castellon (Comunitat Valenciana) and Ibiza (Balearic Islands), 51 and 100 km, respectively (Castilla *et al.* 1998a). The geological origin of this archipelago is dated between 1-0.3 Ma ago which corresponds to the period after Pleistocene volcanic episodes (Aparicio *et al.* 1991; Juan *et al.* 2004). Their formation is a consequence of the Mediterranean Cenozoic volcanism.

These islands have not always been isolated from the mainland according to some authors (Castilla *et al.* 1998b), because during the last glaciations, in particular the Würm (mid and low Pleistocene), the Mediterranean Sea level dropped approximately 120 m. The channel between the Iberian Peninsula and the Columbretes appears to have a depth of approximately 90-100 m, and hence both territories are likely to have been connected.

The archipelago comprises four different groups of islets (Figura 1): i) Grossa (13 ha), Mascarat, Senyoreta and Mancolibre, ii) Ferrera (1.5 ha), Espinosa, Bauzá, Valdes and Navarrete; (3) Foradada (1.6 ha), Lobo (0.5 ha) and Méndez Nuñez; (4) Carallot (0.1 ha), Cerquero, Churraca and Baleato (Castilla i Bauwens, 1991).

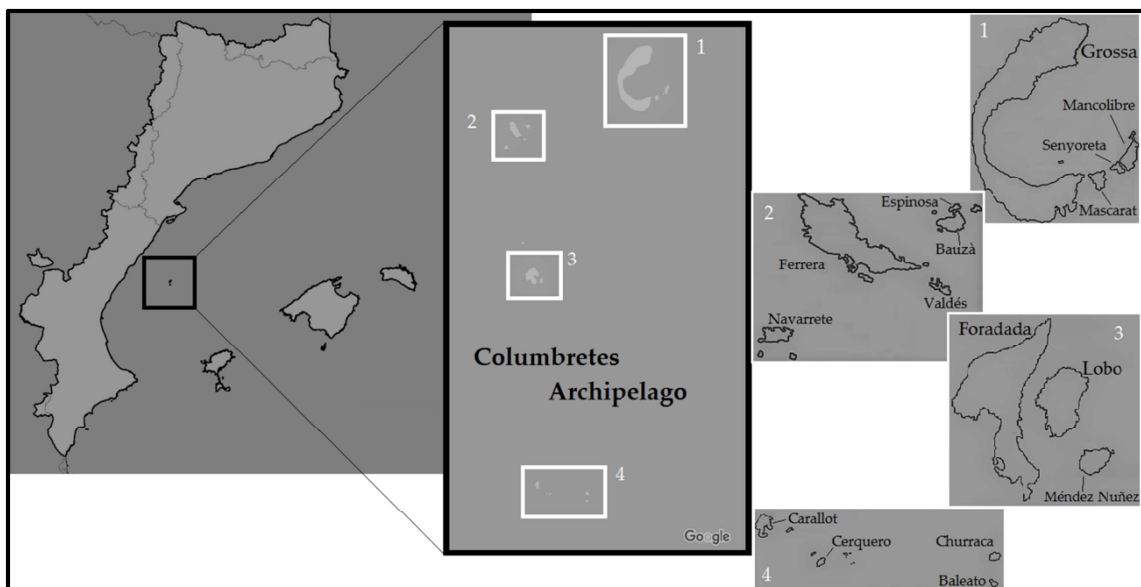


Figura 1. Columbretes archipelago.



In general, the archipelago has remained uninhabited (except for lighthouse keepers who were present from 1855 until 1975). Some islands (Foradada, Ferrera and Bergantin) were used for military exercises that used live ammunition and it is important to highlight their notorious effects on the flora and fauna of the islands. Some examples of the military impact has been the extermination of vipers and dramatic reduction of scorpions, burning natural vegetation and the introduction of domestic species as pigs, rabbits, cats and goats. Fortunately, in 1988, the islands of the Columbretes were declared a natural reserve and in 1990, their marine surroundings were considered as marine reserve. Consequently, the conservation and preservation of endemic species was the main goal (Castilla i Bauwens 1991). The extant terrestrial vertebrate fauna consists of some breeding bird species (*Falco eleonora*, *Larus audouinii*, *Hydrobates pelagicus*, etc.) and the endemic lizard recently named *Podarcis liolepis atrata* (Salvador i Carretero 2016).

The ancestor of all Columbretes *Podarcis* may have arrived on the islands from the mainland 20000 years ago during the last glaciation (Würm) (Castilla *et al.* 1998b). The species is present on only four small islets of the archipelago (Grossa, Mancolibre, Foradada and Lobo, all sampled in this study) due to the small extension and limited food resources on the rest of the islets (Castilla i Bauwens, 1991; Castilla 2000). The conservation status of this endemic species is still not defined due following its recent taxonomic change, although it was considered vulnerable for the national institutions. It is important to highlight the fragmentation of the different populations, the reduced habitat and the low number of individuals, characteristics that make this species susceptible to extinction (Castilla *et al.* 2006; Roca 2016).

The individuals from Columbretes archipelago have no clear taxonomic designation; firstly, they were considered part of the *Podarcis hispanica* complex (*P. hispanica atrata*) and as independent species *Podarcis atrata* (Castilla *et al.* 2008). Recently the *hispanica* complex has been divided into different species, one of them named *P. liolepis*. It has been suggested that Columbretes *Podarcis* may be best considered as a subspecies of *P. liolepis* (Renoult *et al.* 2010, Geniez *et al.* 2014). Due to the deep restructuration, that has affected the systematic of several taxon of the *P. hispanica* complex in the last years. More analysis are required to clarify the status of the endemic lizard from the Columbretes.

Renoult *et al.* (2010) studied different populations from across the distribution of *P. liolepis* and obtained important discordance between mitochondrial markers, nuclear markers and morphological characters in populations from the Valencia region. They also observed a high number of admixed individuals for the lineages *P. liolepis*, *P. hispanica sensu stricto* and Columbretes *Podarcis*. These three groups could correspond to different clades within the same species (Santos 2014).

Many questions are still unsolved so more studies are needed to understand the differentiation between the lizard species endemic to Columbretes and its sister taxa from the mainland (Iberian Peninsula). The main aim of this study is to provide new phylogenetic information using both mitochondrial (mtDNA) and nuclear DNA

(nDNA) markers. Analyses using both markers including individuals from different populations will contribute to improve the knowledge of the origins of the Columbretes *Podarcis* and therefore reveal new insights into their biogeographical history, allow more concrete taxonomic proposals to be made and consequently provide important information for conservation bodies.

Materials and methods

Sampling

Lizards were caught by careful noosing in their natural habitats. We were careful to remove the minimal amount of tail tissue. After removal, the tissue was immediately stored in 100 % ethanol. All lizards were released at the same point of capture. In total, eighty-two individuals from different *Podarcis* species were captured. Samples and their locations are described in **Table 1** and **Figure 2**.

DNA Amplification and sequencing

A standard phenol-chloroform protocol was used for DNA extraction (Sambrook *et al.* 1989). Six partial nuclear genes were amplified and sequenced for the samples: i) melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*), ii) recombination-activating gene 1 (*RAG1*), iii) apolipoprotein B gene *APOBE28*, iv) lipoprotein gene *BLC9L*, v) transcription factor gene *KIAA2018* and vi) kinesin family member *KIF24*. Primers are described in our previous work (Buades *et al.* 2013; Rodríguez *et al.* 2017).

The following six non-overlapping mtDNA fragments were obtained for each specimen: i) partial 12S rRNA, ii) partial tRNA_{Glu} and partial cytochrome b (*Cytb*), iii) partial *Cytb* and partial tRNA_{Thr}, iv) partial control region (CR) and v) two partial subunits of the NADH dehydrogenase gene and associated tRNAs (referred to as *ND1*, *ND2*, tRNA_{Ile}, tRNA_{Gln}, and tRNA_{Met}). Primers and amplification conditions are the same as those used in our previous studies of *Podarcis* (Terrasa *et al.* 2009; Rodríguez *et al.* 2013, 2014, 2017).

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

Phylogeny analysis

Preliminary phylogenetic trees for both markers were estimated using the Neighbor-Joining method (Saitou i Nei 1987) in MEGA7 (Kumar *et al.* 2016) and run for 10.000 bootstrap replicates.



Table 1. Species and localizations of the sampled populations.

| Locations | | Samples | Locations | Samples | |
|--------------------------|----------------------------|--|---------------------------|------------------------------|----------------------|
| <i>Podarcis muralis</i> | | | <i>Podarcis hispanica</i> | | |
| 1 | Senda del Oso | MOP1 | 15 | Tiermes (Soria) | HT1 |
| 2 | Grávita (Ría Villaviciosa) | MGV1 | 15 | Río Pedro (Soria) | HP2 |
| 3 | Villaviciosa | MLL1-2 | 16 | Burjassot | HB2 |
| 4 | San Celorio | MSS1 | 17 | Don Benito | HD1 |
| 5 | Pendueles | MPN1 | 18 | Aranjuez | HVA1-4 |
| 6 | San Vicente Barquera | MVB1 | 19 | Golondrina | HGG1-5 |
| 7 | Puerto San Glorio | MPG2-5 | 20 | Fuenfría | HGF, HGF5, HGF1-2 |
| 8 | Cervera (Pisuerga) | MSP1-5 | 21 | Pedrezuela | HVP2-5 |
| 9 | Pirineus | PM2-11, PM13-15 | 22 | Los Santos (Salamanca) | HS1 |
| 10 | La Pinilla | MLP1, MLP3 | 22 | Cabrerizos (Salamanca) | HC1 |
| <i>Podarcis liolepis</i> | | | 22 | Escorial de la Sierra (Sal.) | HE4, His3 |
| 11 | Grossa (Columbretes) | AB1, AB3-AB5, AB7, AB13, AB33, AB44 | 22 | Mogarráz (Salamanca) | HM3 |
| 11 | Foradada (Columbretes) | AF2 | 23 | La Baña | HÑ1 |
| 11 | Mancolibre (Columbretes) | AM2 | Other species | | |
| 11 | Lobo (Columbretes) | AO3 | 24 | <i>Podarcis bocagei</i> | HÑ2 |
| 12 | Finatge Peñagolosa | HF9 | | La Baña | |
| 12 | San Juan de Peñagolosa | HJ2-4 | 25 | <i>Iberolacerta galani</i> | HÑO |
| 12 | Peñagolosa | HPC8 | | La Baña | |
| 13 | Pirineus | PL3, PL36, PL60 | | | |
| 14 | Sazajarra | HL1 | | | |

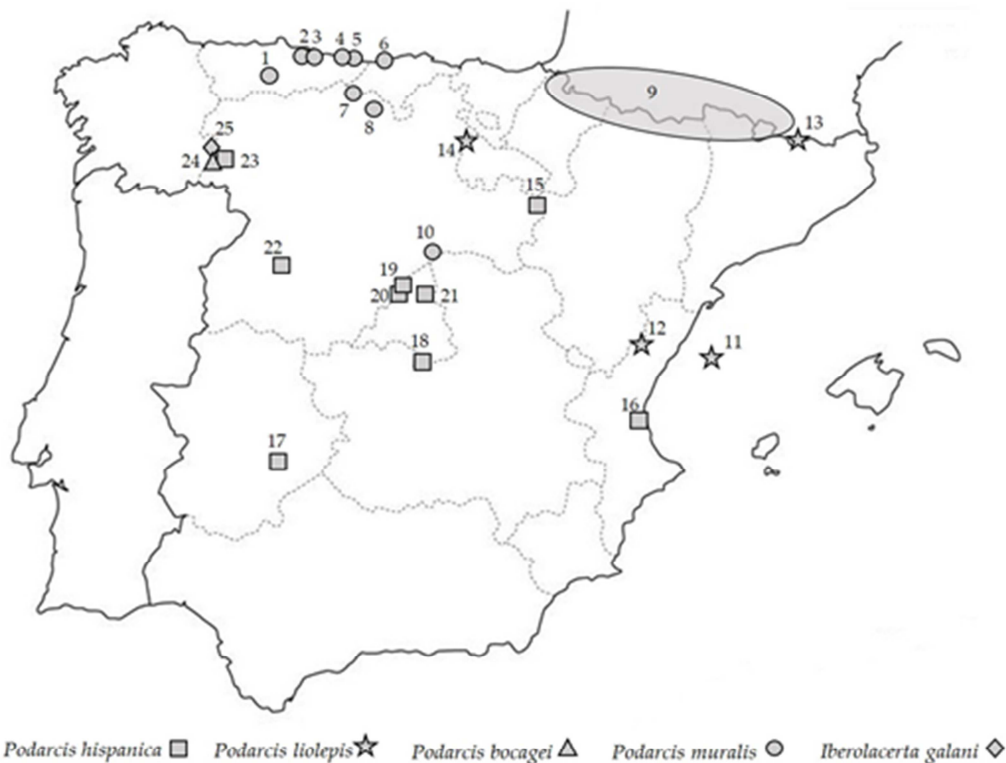


Figure 2. Localizations of the lizards sampled all in the Iberian peninsula.

Preliminary results

Sequences of both molecular markers are still in preparation to be deposited in GenBank.

MtDNA

In this analysis we obtained a total fragment of 2389 pb from 12S rRNA (383 bp), CR (506 bp), *ND1* (62 bp), *ND2* (415 bp), *Cytb* (813 bp) (two fragments), tRNAs (210 bp).

Nuclear DNA

The length of the partial nuclear loci studied were: *MC1R* (711 bp), *RAG1* (939 bp), *APOBE28* (489 bp), *BLC9L* (497-609 bp), *KIAA2018* (611-687 bp) and *KIF24* (559 bp). STRs were found in two of these nuclear genes (*BLC9L* and *KIAA2018*). The *KIAA2018* sequence contained a polymorphic microsatellite with a proline repeat (CCT) ranging from 5-10. The (CCT)₇ repeat was the most frequent. The partial sequence of the *BLC9L* also present an STR with a variable number of repeats for glutamine and proline. The common structure of this microsatellite was (Gln)₃ (Pro)₅₋₉ (Gln)₅ with the unique exception of one sample (PM2) from the species *P. muralis* that contained an histidine: (Gln)₃ (Pro)₆ (His).

Phylogeny trees

The preliminary trees for mtDNA and nDNA are shown in **Figure 3**. These preliminary analyses used only a few individuals of the sampled species.

The nDNA phylogenetic tree was obtained from all concatenated nuclear loci (3865 pb). This tree groups the Columbretes samples within the same lineage as *P. liolepis* from the Iberian Peninsula. They are not separated into two different taxonomic groups, possibly due to the poor resolution of the nuclear markers. The other species of *Podarcis* analysed also are grouped in independent clades and with well statistical support: *Podarcis* of the Balearic Islands form a taxonomic group (0.99), *P. muralis* (0.98); and clades slightly less supported are: *P. virescens* (0.74) i *P. guadarramae* (0.73).

The mtDNA tree is broadly similar with the nDNA tree. The main difference is that mtDNA separates the lineage containing *P. liolepis* into two primary groups, one containing Iberian Peninsula populations and one containing Columbretes archipelago populations (unlike the nuclear markers). The following species are, like in the nDNA tree, in a separated group and well supported (0.99 in all species): *P. guadarramae*, *P. virescens*, *P. muralis*, and the Balearic species: *P. lilfordi* i *P. pityusensis*.

Although we have to consider that these are only preliminary results and more samples and more robust analyses are required, we can conclude that they are in accordance with a recent taxonomic proposal that the *Podarcis* from Columbretes is most closely related to *P. liolepis*.

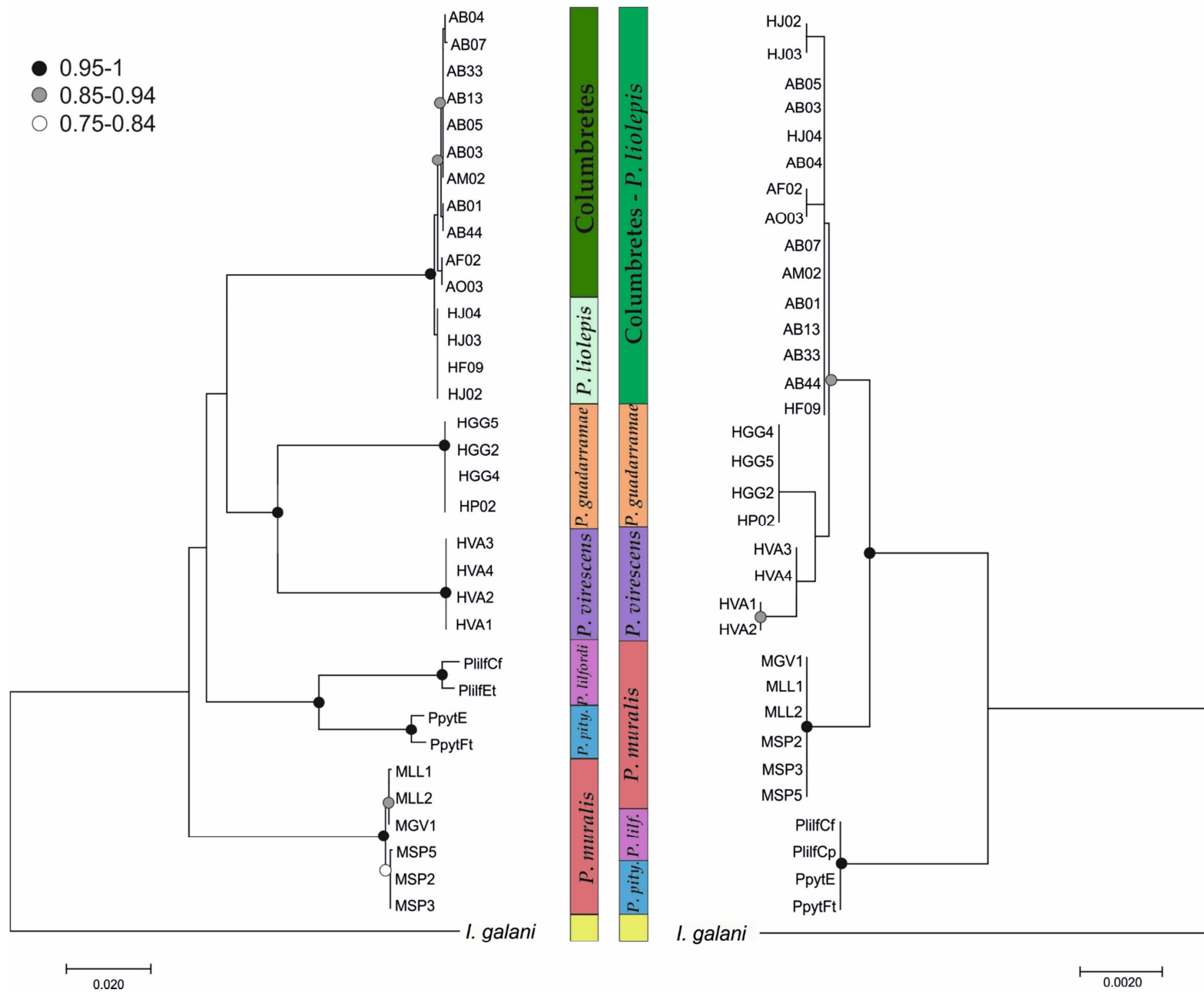


Figure 3. Phylogenetic trees obtained from the analysis of mtDNA (left) and nDNA (right).

5. DISCUSSIÓ GENERAL

El procés de canvi evolutiu ha despertat l'interès de nombrosos investigadors al llarg de la història; en els seus inicis en base a l'observació de les diferències dins i entre espècies. Els trets morfològics (forma, color i també de comportament) foren la base a partir de la qual es basaven els coneixements sobre el canvi evolutiu. Posteriorment ja a mitjans del segle passat, es varen desenvolupar les tècniques moleculars com a eines fonamentals per a la biologia evolutiva. Aquestes varen representar un canvi important en la forma d'estudiar i analitzar l'evolució. A la dècada dels 60, les proteïnes i la seva variació foren els primers marcadors emprats i poc després, a finals dels 70, ja es varen desenvolupar les tècniques per analitzar els primers polimorfismes d'ADN, en base als distints patrons de restricció. L'ús de l'ADNmt va sorgir amb força a la dècada dels 80, i ha estat i segueix essent encara avui en dia, una de les principals molècules per a l'estudi de la variació genètica de les poblacions (Awise i Bowen 1994).

L'ADN mitocondrial té diverses característiques entre les que podem destacar que: i) és de fàcil obtenció i amplificació en part degut a l'elevat nombre de còpies que tenen les cèl·lules; ii) en general, els gens mitocondrials es troben conservats en animals; iii) presenta una alta taxa de variació, iv) no presenta recombinació (Galtier *et al.* 2009) i v) té una herència materna a la majoria d'espècies. Aquests trets han facilitat que tingui una àmplia utilització en diverses àrees de la biologia evolutiva, essent molt útil per analitzar estructures poblacionals així com les relacions entre diferents espècies. En definitiva, ha permès establir relacions filogenètiques a distints nivells taxonòmics: entre poblacions, espècies i també a nivells superiors (Bermingham i Moritz 1998).

La informació obtinguda mitjançant els polimorfismes de restricció era limitada, per això els primers estudis en base a la seqüenciació de l'ADNmt representaren una important font de coneixement, ja que es disposava de fragments seqüenciats amb una certa llargària, els quals tenen una elevada variabilitat en la seqüència i també en la seva longitud. Per exemple, la descripció dels primers encebadors (Kocher *et al.* 1989) obtinguts a partir de l'alineació de seqüències de mosques, granots i mamífers, permeten amplificar regions dels gens *Cytb*, la regió control i el 12S ARNr en un bon nombre d'espècies animals; i un altra set d'encebadors universals (Folmer *et al.* 1994), per un fragment de 710 pb de la subunitat 1 citocrom C oxidasa (*COI*), permet l'amplificació d'11 fílums diferents d'invertebrats amb l'objectiu d'obtenir seqüències informatives per als estudis filogenètics.

Conjuntament amb una extensíssima utilització de les seqüències de l'ADNmt podem observar l'aparició d'alguns treballs que qüestionen el seu ús com a únic marcador molecular. Per exemple, Harrison (1989), comenta que en la majoria de casos els resultats obtinguts en base a aquesta molècula són coincidents amb els resultats previs realitzats amb marcadors morfològics, de comportament o al·loenzims. Però també remarca que hi ha un nombre considerable d'estudis amb resultats discrepants que l'autor relacionaria amb: i) una introgressió diferencial de l'ADNmt i/o ii) amb l'extinció a l'atzar de llinatges mitocondrials en una població amb un antecessor polimòrfic. Per una altra banda, Awise (1998), també apunta que l'ADNmt és un únic locus, donat que s'hereta de forma única i no presenta recombinació, per tant, només reflecteix una petita part de la informació genealògica; així i tot, fins a finals del segle



passat ha estat la principal molècula emprada en estudis filogenètics (que representa més del 80 % dels marcadors emprats en aquests estudis). En la mateixa línia es troba Godinho *et al.* (2008), el qual exposa que encara que s'emprin tècniques rigoroses i sofisticades que combinin filogènia, coalescència i demografia, entre altres, l'ADNmt és un factor limitant. Els resultats del seu treball en *Lacerta schreiberi* indiquen que l'ús de diferents tipus de marcadors moleculars (més concretament, 16 loci nuclears) és més adequat per estudiar segons quin tipus de processos complexos (com són el de fragmentació, expansió i mescla), ja que emprant només ADNmt aquests no foren detectats. Renoult *et al.* (2009), apunta un aspecte interessant ja que compara els resultats filogenètics obtinguts a partir de marcadors morfològics (24), mitocondrials (regió control amb un fragment de 460 pb) i nuclears (8 STR i β -fibrinogen de 350 pb) del complex *P. hispanica*. Els autors analitzen les diferències trobades de la següent forma: primer de tot estudien si hi ha discrepàncies taxonòmiques entre característiques morfològiques i l'ADNmt. Efectivament, en troben diversos casos, i a continuació, ho comparen amb els resultats aconseguits amb l'ADNn). També consideraren que si els patrons filogenètics obtinguts amb ADNmt i ADNn són coincidents, les discrepàncies amb els trets morfològics no eren unitat filogenètiques com a tal, sinó que eren degudes a adaptacions locals o a una major plasticitat fenotípica. Mentre que si el marcador discrepant era l'ADNmt (enfront de l'ADNn i els trets morfològics), aquest fet indicaria una introgressió o presència incompleta de llinatges de l'ADNmt d'una espècie respecte d'una altra.

Així pareix evident que els estudis filogeogràfics basats en un únic marcador (tant mitocondrial com nuclear) sols mostren una petita part de la història evolutiva d'un grup taxonòmic o població, fet que pot donar lloc a interpretacions errònies ja que els gens poden tenir taxes de mutació diferents o també mostrar una història evolutiva diferent (Patwardhan *et al.* 2014). Per una banda l'ADN mitocondrial sols reflecteix l'evolució de la via materna, mentre que els nuclears, per la seva banda, s'ha de considerar que pateixen efectes de la pressió de la selecció. Per tant, necessitaríem el conjunt de diversos loci per poder comprendre un procés evolutiu complex, loci genèticament independents amb una funcionalitat diversa per tal d'evitar associacions funcionals (Amrine-Madsen *et al.* 2003). Així doncs, diversos autors (Avice 1998, Bermingham i Moritz 1998, Patwardhan *et al.* 2014, entre altres) consideren que en un futur s'hauria de tendir a utilitzar diversos marcadors moleculars, i incrementar l'ús dels nuclears i no exclusivament de l'ADNmt. Aquests nous marcadors moleculars són indispensables per contrastar resultats previs i aportar una major resolució (Amrine-Madsen *et al.* 2003). Com a exemple, l'estudi realitzat (Magri *et al.* 2006) a faigs (*Fagus sylvatica*) indica que l'ús de diferents marcadors moleculars poden desafiar resultats anteriors mostrant noves perspectives en la història d'aquesta espècie.

Cal indicar que no tots els marcadors són adequats per estudis filogenètics, ni tampoc tots els marcadors són adequats per a qualsevol grup d'organismes (Patwardhan *et al.* 2014). L'ús de diversos marcadors aporta una major robustesa si tots coincideixen en els resultats filogenètics, però també aporta un major coneixement de la història evolutiva dels grups taxonòmics estudiats quan aquests són discordants (Renoult *et al.* 2009).

Algunes de les característiques que haurien de complir els marcadors 'ideals' serien: i) gens d'una sola còpia (ADNmt i marcadors nuclears) són més adients que els de còpia múltiple; ii) gens fàcils d'alinejar (un mateix gen pot presentar diferents longituds entre diversos grups taxonòmics al presentar insercions o delecions, la qual cosa complica la seva alineació); iii) taxa de substitució òptima, ja que gens amb una elevada taxa de mutació podrien saturar-se degut a l'elevat nombre de substitucions; iv) disponibilitat d'uns encebadors específics pel marcador molecular; i v) nivell de variació no molt alt degut a què en aquesta situació no mostraria un ancestre real (Patwardhan *et al.* 2014).

Al llarg del temps s'han emprat diversos marcadors nuclears, entre els quals destacarem els següents:

- Gens nuclears ribosomals: l'ARN ribosomal es considera un dels marcadors més bons ja que és universal i està format tant per dominis conservats com d'altres variables. Aquests gens en general presenten una taxa d'evolució lenta i són adequats per a estudis filogenètics d'espècies distants: i) 16S ARNr: el gen amb una longitud d'uns 1.550 pb té regions conservades i variables, i representa l'eix principal en estudis taxonòmics en bacteris; ii) 5S ARNr: molècula d'uns 120 pb emprada per filogènies encara que el seu ús ha estat criticat degut a la seva poca longitud ja que els llocs informatius són molt limitats; i iii) 28S ARNr: té una longitud d'uns 811 pb (Patwardhan *et al.* 2014).
- Microsatèl·lits/STR: són seqüències de repetició amb un alt grau de polimorfisme. Ara ja fa quasi 25 anys que foren descrits (Bruford i Wayne 1993) i tenen un paper molt important en els estudis genètics poblacionals (Zhang i Hewitt 2003).
- INDELS: representen informació filogenètica a tenir en compte, encara que la majoria de mètodes bioinformàtics no solen valorar correctament els buits que generen les seves alineacions, ja que en la majoria de mètodes són ignorats o es consideren ambigus (Zhang i Hewitt 2003).
- Introns: aquestes regions gèniques no codificants tenen una menor pressió selectiva (que els exons) i per tant, són més variables (Yang *et al.* 2007), fet que els fa útils com a marcadors evolutius per estudis poblacionals o espècies molt properes i per a la seva amplificació es dissenyen els *primers* en els exons adjacents, ja que són regions conservades (Lessa 1992; Igea *et al.* 2010). Cal remarcar que no tots els introns són aptes per filogènies, ja que pel fet de presentar una gran diversitat de taxes evolutives, alguns estan molt conservats (es creu que degut a la seva implicació en certes funcions) i d'altres són molt variables i inclouen grans reordenacions genòmiques. Es coneix l'increment en el seu ús en estudis filogenètics, sobretot en organismes relacionats (Matthee *et al.* 2007). A continuació, alguns exemples: en aus (Armstrong *et al.* 2001; Birks i Edwards 2002;



Weibel i Moore, 2002), en rosegadors (DeBry i Seshadri 2001) i en plantes (Howarth i Baum 2002).

- Exons nuclears o NPCL (*Nuclear Protein Coding Loci*): pel fet de ser regions codificants són seqüències altament conservades i, per tant, adequades per fer filogènies entre grups distants. La seva menor variabilitat facilita el disseny d'encebadors per a la seva amplificació i posterior alineament (Thomson *et al.* 2010). Encara que també presenten alguns inconvenients com la presència de qualche intró dins la seva seqüència (fet que pot dificultar l'amplificació o alineament), juntament amb la impossibilitat de detectar gens paràlegs o gens de famílies properes (la qual cosa pot provocar l'obtenció d'una filogènia errònia) (Townsend *et al.* 2008).

Encara que en els darrers anys hi ha una major disponibilitat de marcadors nuclears, la majoria dels estudis filogenètics es basen únicament en ADNmt. Pocs són els estudis que comparen el temps de divergència obtingut amb diferents gens nuclears de l'obtingut amb ADNmt (Mulcahy *et al.* 2012). A finals de la dècada dels 90, pocs treballs apostaven pels gens nuclears com a marcadors moleculars degut a dificultats tècniques i la necessitat que tinguin una alta taxa de mutació i una baixa recombinació (Avice 1998). Hare (2001) descriu dues característiques que limiten el seu ús en la filogeografia: la presència de recombinació impedeix la reconstrucció d'arbres i la baixa taxa de mutació redueix el nombre de polimorfismes informatius donant lloc a una baixa resolució. Per exemple, l'ús dels introns es veia condicionat pel seu major temps de coalescència i la seva evolució reticulada degut a la recombinació (Bermingham i Moritz 1998).

Saint *et al.* (1998) també destaquen el reduït nombre d'exons nuclears descrits però en el seu cas, posa un exemple, el *C-mos*. S'analitza la idoneïtat d'aquest gen com a candidat per estudiar relacions filogenètiques, ja que es caracteritza per ser de còpia única i no tenir introns. L'estudi demostra que no només és adequat per establir relacions filogenètiques entre i dins diferents famílies d'escamosos, sinó també per contrastar els resultats obtinguts en altres marcadors moleculars.

Per tant, les seqüències més adequades per a estudis d'organismes propers són: gens amb una taxa de canvi lent, ja que s'empren per grups bastants diferents, i regions no codificants de l'ADNmt que són per estudis de diferents individus d'una població (Patwardhan *et al.* 2014). Si ens centrem en la utilitat dels nuclears, Hare (2001), els considera adequats (juntament amb altres marcadors d'evolució ràpida) per processos evolutius recents. En altres estudis (i.e. Saint *et al.* 1998) es fa referència a l'ús d'aquests marcadors per separacions intermèdies (d'entre 50-300 Ma).

A continuació s'exposen alguns estudis filogenètics recents on ja es veu una tendència al canvi en els marcadors moleculars emprats.

Barley *et al.* (2010), a través de 14 gens nuclears, aconsegueixen resoldre (amb un gran suport) diversos nodes, que fins al moment no estaven gens clars, de la filogènia de les tortugues. Aquest estudi demostra la gran utilitat d'emprar diferents

loci (en un nombre mínim i amb una suficient variabilitat) en estudis filogenètics complicats i l'efectivitat dels marcadors nuclears en separacions recents. Wiens *et al.* (2012) analitza la filogènia del grup escamosos (grup en que s'han realitzat nombrosos estudis evolutius) emprant 161 espècies i 44 gens nuclears (aprox. uns 33.700 pb), el major conjunt de dades conegut fins aquell moment. Posteriorment, Pyron *et al.* (2013), també a escamosos, mostra com en els darrers 10 anys la filogènia del grups ha anat variant degut a l'ús en alça dels marcadors moleculars. Aquest estudi analitza la filogènia en base a 12 gens (7 nuclears i 5 mitocondrials que sumen 12.896 pb) a 4.161 espècies. Altres grups d'organismes, com les plantes, han vist resolta part de la seva filogènia gràcies a les aportacions dels gens nuclears, per exemple a 91 espècies d'angiospermes, que representen 46 ordres (Zhang *et al.* 2012).

Un article recent (García-Porta *et al.* 2017) mostra com gràcies als marcadors moleculars la subespècie *Pristurus rupestris rupestris* del gènere dels dragons (*Gecko*), que es creia era una única subespècie en realitat podrien ser 14 espècies diferents segons els resultats d'aquest estudi filogeogràfic. Són espècies morfològicament molt similars i ha estat l'ús de dos gens mitocondrial (ARNr 12S i *Cytb*) i 4 nuclears (*MC1R*, *RAG1*, *RAG2* i *C-mos*) que ha revelat que en realitat és un complex. Aquest fet ajudarà a adequar les polítiques de conservació de l'espècie.

Tots aquests estudis estan realitzats en els darrers 7 anys i tenen en comú que empren més gens nuclears que mitocondrials en les seves anàlisis. Aquesta tesi intenta evidenciar el paper que tenen els gens nuclears com a marcadors moleculars per estudis evolutius dins el gènere *Podarcis*. En el nostre cas s'han emprat, més concretament, diferents exons com una bona eina per aprofundir en la història evolutiva de diferents espècies d'aquest gènere: *MC1R*, *RAG1*, *APOBE28*, *BLC9L*, *KIAA2018* i *KIF24*.

Historia evolutiva de *P. tiliguerta*

L'espècie *Podarcis tiliguerta* ha mostrat a estudis filogenètics previs (en base a trets morfològics i altres amb ADNmt) una gran diversitat, la qual cosa indica la possibilitat que es tractés d'un complex d'espècies. Per això, era necessari un major aprofundiment en el coneixement de la seva estructura mitjançant gens mitocondrials i gens nuclears. Els resultats del nostre estudi, que inclou ambdós marcadors, també indiquen la presència d'una alta variabilitat, més elevada que la detectada en altres espècies properes de *Podarcis*. Donada la manca d'informació a altres espècies només es van poder comparar dades del *MC1R* amb *P. lilfordi* i *P. pityusensis*. Aquestes espècies presenten valors de diversitat (k) de 3,63 i 3,05 respectivament, mentre que *P. tiliguerta* en té 4,08.

Els diferents loci nuclears estudiats en aquesta espècie mostren diferents grups, entre 1 i 2 clades per illa. És important remarcar que independentment del tipus d'anàlisi assajada sempre se separen els individus de l'illa de Còrsega dels de Sardenya, la qual cosa indica que s'hauria de revisar la taxonomia de l'espècie *P.*



tiliguerta, ja que podrien correspondre a dos taxons independents (a falta d'estudis més exhaustius amb característiques morfològiques). Si es comparen els resultats obtinguts dels gens nuclears amb els del mitocondrial podem observar que el nombre de grups trobats és inferior (entre 5-6 clústers en total). Aquestes diferències trobades entre els dos marcadors es justifiquen amb la major variació de l'ADNmt i en conseqüència la presència d'un major nombre de canvis. Cal recordar que els nuclears emprats corresponen a fragments d'exons i, per tant, en ser codificants, la seva variabilitat està més limitada.

L'arbre filogenètic obtingut amb tots els nuclears concatenats (*Additional Figure 1* de la informació suplementària no publicada de l'article) realitzat amb altres espècies (*P. lilfordi*, *P. pityusensis*, *P. filfolensis* i *Iberolacerta galani*) data la separació de l'espècie *P. tiliguerta* de les *Podarcis* de les Illes Balears en aproximadament 11,73 Ma (amb un rang de 6,9-20,9 Ma) amb una gran robustesa ($P=1$). Per una altra banda la separació dels llinatges de Còrsega del de Sardenya seria de fa uns 9,66 Ma aproximadament (5,35-18,72 Ma), node també ben suportat ($P=1$). La comparació amb la datació obtinguda amb l'ADNmt que fou 13,87 i 12,75 Ma, respectivament, indica molta similitud i ambos resultats són concordants amb les estimacions geològiques d'uns 9-15 Ma per a les illes de Còrsega i Sardenya (Álvarez 1972, 1974). Així doncs, els resultats observats per ADNn i ADNmt són molt coincidents tenint en compte les diferents taxes evolutives, i a més, estan d'acord amb el registre geològic, la qual cosa dona un fort suport a la datació.

Les espècies *P. pityusensis*, *P. lilfordi* i *P. filfolensis* se suposa que estan estretament relacionades amb *P. tiliguerta*, ja que totes elles formen part del grup anomenat 'Illes de l'Oest' (Harris *et al.* 1999). La separació del tronc principal i, per tant, l'origen de cadascuna d'aquestes espècies, és la següent: *P. lilfordi* es data en el Plistocè Inferior (Rodríguez *et al.* 2014), *P. filfolensis* també es calcula que es va separar durant el Plistocè (Rodríguez *et al.* 2013), mentre que l'origen de *P. pityusensis* s'estima que es va produir durant el Plistocè Mitjà-Superior. L'origen de *P. tiliguerta* i, fins i tot, la separació entre les poblacions de Còrsega i Sardenya, supera de forma notòria els valors estimats de separació detectats entre distintes espècies dels escamosos (ordre *Squamata*) (Hasbun *et al.* 2005; Pinho *et al.* 2007). A aquest fet s'hi ha d'afegir que en els diferents loci s'ha evidenciat l'existència de monofília recíproca entre les illes, fet corroborat amb la majoria de resultats obtinguts amb els distints mètodes de delimitació d'espècies. Com a conseqüència d'aquests resultats, la separació de *P. tiliguerta* en dues espècies apareix com un fet ben suportat encara que en propers estudis s'intentarà aportar més informació (morfològica i ecològica) per poder descriure aquests nous taxons.

L'aparició de l'espècie *P. tiliguerta* sembla ser deguda a un procés d'especiació al·lopàtrica a partir d'ancestres continentals que van colonitzar la microplaca que aleshores formaven Còrsega i Sardenya. Estudis previs (Arnold *et al.* 2007) suggereixen que els *Lacertini* es diversificaren fa uns 12-16 Ma i generaren els ancestres dels gèneres actuals, per tant l'origen del gènere és posterior a la separació primerenca de la microplaca de Còrsega i Sardenya de la placa Ibèrica (29 Ma). Aquest fet indica que els ancestres accedien durant la rotació de la microplaca de Còrsega i Sardenya a

través de les connexions terrestres que hi havia entre la placa i el continent. Posteriorment la placa es va dividir en dos, aproximadament fa uns 9-15 Ma, cosa que provocà la separació dels llinatges de Còrsega dels de Sardenya, valors que coincideixen amb els obtinguts en els nostres resultats (fa uns 9,66 Ma). Des de la separació de les dues illes la principal causa de diversitat intraespecífica trobada es creu que es degut a la presència d'una orografia molt heterogènia a les illes de Sardenya i especialment a Còrsega.

Melanisme en *P. lilfordi* i *P. pityusensis*

L'existència d'una elevada variabilitat en la coloració és un fet recurrent en un gran nombre de grups taxonòmics, sobretot en vertebrats. Aquesta diversitat també present a rèptils, estudiada des d'un punt de vista evolutiu (Gabirot *et al.* 2014), s'ha proposat com a exemple d'adaptacions a l'hàbitat, adaptacions de comportament, estratègies reproductives i, fins i tot, d'especiació (Cooper i Greenberg 1992; Vercken *et al.* 2007; Olsson *et al.* 2013). El complex sistema pigmentari que tenen els llargardaixos i les serps s'ha relacionat a través de diferents aproximacions amb la important diversitat fenotípica que presenten (Saenko *et al.* 2013; San-Jose *et al.* 2013).

La presència d'individus melànics és un fet comú en moltes espècies, característica que també apareix en un considerable nombre de poblacions de sargantanes. Més concretament en el cas del gènere *Podarcis* de l'arxipèlag balear es van descriure per primera vegada poblacions melàniques a la dècada del 1930 (Eisentraut 1949). S'han formulat hipòtesis que relacionarien l'existència d'aquests fenotips: i) en funció de la dieta, veient-se afavorits per un major consum de matèria vegetal, ii) per a una major protecció enfront dels rajos ultraviolats i iii) amb l'herència com a una característica ancestral (Kramer 1949; Eisentraut 1949, 1954). Encara que estímuls ambientals poden contribuir a la variació de coloració, cal dir que la major part pareix tenir una base genètica (Hubbard *et al.* 2010). La genètica d'aquest fenotip ha estat estudiada per molts autors i no sembla tenir una explicació comuna en tots els casos ja que està causat per diferents gens i diferents tipus de mutacions.

De tots els gens involucrats en el tret melànic, mutacions en el gen *MC1R*, han esdevingut bones candidates per a la seva explicació, per exemple, el melanisme en aus s'ha relacionat amb la presència de mutacions no sinònimes i INDELS en aquest gen (McRobie *et al.* 2009; Guo *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013); i diversos estudis a llargardaixos també han relacionat aquest gen amb la variació de coloració (Rosenblum *et al.* 2004; Manceau *et al.* 2010; Kronforst *et al.* 2012). Aquest gen també es troba entre els que s'han implicat en la diversitat de coloració, i presenta diverses característiques que faciliten el seu estudi, com per exemple: una estructura genòmica senzilla (sense introns); una alta conservació entre els vertebrats, fet que ajuda en el moment de dissenyar primers i consegüentment amplificar-lo. Per això, la majoria d'estudis se centren en la detecció de mutacions puntuals (no sinònimes) que es relacionen amb polimorfismes de color. Grups taxonòmics diferents amb mutacions a llocs homòlegs produeixen fenotips iguals o similars (Hubbard *et al.* 2010). Per



exemple, Nunes *et al.* (2011) varen relacionar dues mutacions a *Lacerta lepida* T162I i S172C amb les coloracions marronoses i negroses respectivament. Aquestes posicions s'han analitzat a les dues espècies de *Podarcis*, però els individus no mostren variació, independentment de la coloració i de l'espècie analitzada.

En les espècies de sargantanes de les Illes Balears hi ha nombroses poblacions melàniques tant a la sargantana balear *P. lilfordi* com a l'eivissenca *P. pityusensis*. Aquest gen nuclear *MC1R* ha resultat ser polimòrfic a les poblacions d'ambdues espècies, però el polimorfisme trobat no es relaciona amb la presència d'individus melànics a les *Podarcis* endèmiques de les Illes Balears ja que cap de les substitucions trobades són compartides per tots els individus melànics analitzats. Cal comentar que sols vam trobar una associació significativa a la posició 681 on hi havia un canvi sinònim G/A (essent A més abundant a les poblacions melàniques); com que no implicava canvis en la proteïna difícilment podria ser l'explicació del melanisme. Altres dues mutacions que compartien algunes poblacions melàniques de *P. lilfordi* (Foradada, Colomer, Guàrdia i Moltona) són dos canvis sinònims situats a la proteïna a les següents posicions: Thr¹¹¹ i Ser²²⁷. Encara que, les poblacions també melàniques d'Aire i Malgrats, de l'espècie *P. lilfordi*, juntament amb Escull vermell i Bleda plana de *P. pityusensis*, no presenten aquests canvis. Fet que fa poc probable que aquests canvis es relacionin amb el melanisme en qualsevol de les dues espècies. En alguns mamífers i aus (tant poblacions salvatges (Nachman *et al.* 2003) com domèstiques (Kijas *et al.* 1998; Kerje *et al.* 2003)), el melanisme s'ha relacionat amb delecions, però pel contrari no es varen detectar canvis estructurals a les dues espècies de *Podarcis* estudiades. Tampoc es va trobar relació entre els canvis detectats en aquest marcador i els altres principals fenotips observats a les nostres mostres.

Per a ser un gen nuclear codificant mostra un destacat grau de polimorfisme a les poblacions d'aquest estudi, ja que s'han trobat 45 posicions variables respecte de *P. sicula*. De les posicions anteriors, tres es podrien considerar *hotspots* degut al seu alt grau de variabilitat. Els canvis sinònims són més nombrosos, fet esperable amb una evolució neutral; però, així i tot, 13 substitucions (la majoria d'elles es localitzen al domini transmembrana de la proteïna) són no sinònimes i codifiquen per aminoàcids diferents.

La presència d'individus melànics ha tingut diverses explicacions, com que és un caràcter antic que prové de llangardaixos del gènere *Cordylus* (Daniels *et al.* 2004), o que ha estat afavorit per la selecció al gènere *Podarcis* degut als seus efectes termoreguladors (Eisentraut 1954). Però pel contrari al que aquestes teories suggereixen, el melanisme no pareix que sigui una característica ancestral ja que la història poblacional obtinguda amb l'ADNmt indica que la condició ancestral seria la no melànica, la qual és la més comuna a la resta de *Podarcis*, i per tant, el melanisme hauria sorgit en diferents ocasions dins els clades de les Illes Balears. Finalment, cal remarcar que tampoc s'ha trobat efecte de la selecció a les poblacions melàniques.

Encara que l'ambient pot influir en la variació del color, sembla que la major part està controlada genèticament (Hubbard *et al.* 2010). En el nostre cas, sembla que els responsables genètics de la variació de fenotip no serien canvis genòmics a l'*MC1R*.

Donat que mutacions puntuals o reordenacions en el *MC1R* no semblen ser les responsables del melanisme, vam analitzar si canvis en l'expressió d'aquest gen podrien estar involucrades en la condició melànica.

En els darrers anys diversos estudis han analitzat l'expressió diferencial d'ARN a través de qPCR i RNAseq. Se coneix que els estudis en base a nivells d'ARN depenen del teixit i el temps o moment de les anàlisis, encara que es té poca informació de com aquests factors afecten la síntesi de melanina als escamosos. El procés de melanogènesi aparentment es produeix a l'inici del desenvolupament, ja que els individus juvenils són totalment melànics. Malgrat la limitació d'informació que es té al respecte, i que els gens implicats pugin estar menys expressats en individus adults, la majoria d'estudis en rèptils es realitzen en adults i amb mostres de coa. Per exemple, podem destacar Fulgione *et al.* (2015) que varen obtenir una expressió diferencial entre individus melànics i no melànics a l'espècie *P. sicula*. Contràriament a aquests estudis previs, no s'han trobat nivells més elevats de l'ARNm del gen *MC1R* individus melànics de les poblacions de *P. lilfordi* i *P. pityusensis*. Els nostres resultats estan en concordança amb l'estudi previ fet amb aquestes espècies de *Podarcis* i dels quals es pot concloure que canvis d'expressió o en la seqüència de l'*MC1R* no són responsables de la presència del melanisme.

La pigmentació és un procés complex en què intervenen més de 120 gens, entre els quals destaca la importància del gen *MC1R* (Dessinioti *et al.* 2011). Però tal com ocorre amb nosaltres, tampoc s'han trobat diferències d'expressió en estudis d'espècies com: ratolins (Steiner *et al.* 2007), pollastres (Zhang *et al.* 2015), macacos (Bradley *et al.* 2013), cans viverrins (*Nyctereutes procyonoides*) (Han *et al.* 2012) o ovelles (Peñagaricano *et al.* 2012).

Cal considerar altres causes de la presència d'individus melànics. Per exemple algunes investigacions a escamosos troben diferències histològiques entre individus melànics i no melànics. Els autors d'aquests treballs (Kuriyama *et al.* 2013, 2016) troben els tres tipus de cromatòfors (xantòfors, iridòfors i melanòfors) als individus no melànics, enfront dels individus melànics que sols presenten un únic pigment, els melanòfors. Encara que no s'hagi trobat cap estudi similar en el cas concret del gènere *Podarcis*, seria interessant aprofundir en el tema en futurs treballs ja que podria ajudar a obtenir nous gens candidats per a l'estudi del melanisme. I per una altra banda es troben els resultats obtinguts per Gabirot *et al.* (2014), els quals es basen en l'estudi de diferents fenotips de tres poblacions de *P. hispanica*, i les relaciona amb diferències adaptatives en funció del seu hàbitat i característiques climatològiques. Els autors observen com les poblacions que viuen a hàbitats amb un clima més fred, presenten una coloració dorsal més obscura, i per tant, connecten el melanisme amb efectes termoreguladors (s'encalenteixen de forma més ràpida i mantenen la temperatura durant més temps). També és coincident el fet que aquestes poblacions més obscures es troben en un hàbitat amb un terreny més fosc, així es mimetitzen amb el seu entorn i poden evitar els depredadors. Per una altra banda, la coloració ventral (presenten tonalitats de groc, vermell i taronja) estaria lligada a l'alimentació, segons els autors, ja que un dels pigments (els carotenoides) s'obtenen directament de la dieta. Però també



es pot considerar un caràcter sexual secundari ja que depèn del nivell hormonal i al fet de presentar dimorfisme sexual.

Estudiar el perfil d'expressió és una potent eina per poder identificar els gens que s'expressen en diferents teixits (entre els quals trobem la pell). Encara que cal comentar que la majoria d'investigacions que estudien la diferència d'expressió entre individus melànics i no melànics estan realitzades en espècies comercials (Tae-Hun *et al.* 2006; Fan *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2015) i molt poques empren poblacions naturals (Kingsley *et al.* 2009; Fulgione *et al.* 2015). Per això, amb els resultats negatius en relació a l'expressió del gen *MC1R*, vam plantejar l'estudi de l'expressió de tot l'exoma on es varen detectar gens amb una expressió diferencial a les mostres melàniques i no melàniques.

Diverses investigacions han intentat relacionar la base genètica de la coloració amb d'altres característiques (per exemple, Ducrest *et al.* 2008; Alho *et al.* 2010). Sobretot cal destacar el treball de Roulin i Ducrest (2013), en el qual identifiquen una certa relació entre fenotips obscurs i cinc característiques: i) una major resistència a l'estrès, ii) una resposta inflamatòria reduïda, iii) una millor regulació entre la ingesta i l'energia gastada, iv) una major resistència a l'estrès oxidatiu i v) una major activitat sexual. En els nostres resultats s'observa en les sargantanes no melàniques una major expressió dels gens implicats en la resposta a l'estrès, fet que no coincideix amb el cas i). En canvi, si que s'observa el cas ii) en què els individus melànics tenen una major resposta inflamatòria, en el nostre cas concret hi ha una major expressió del gen *antigen processing via MHC II* i dels gens *Wnt signalling* (*Wnt-protein binding* i *Wnt-activated receptor activity*). Els individus melànics també mostren una major taxa metabòlica (fet relacionable amb el punt iii) el qual fa referència a la ingesta i energia consumida) quan presenten una elevada activitat ATPasa, una major diferenciació de cèl·lules grasses i una major regulació en el transport de carbohidrats. Cal comentar que, per altra banda, no s'han trobat diferències d'expressió en gens implicats en els dos darrers punts que afecten a l'estrès oxidatiu i a l'activitat sexual. Per tant, resumint l'obtingut, els individus melànics emprats per a l'estudi de l'exoma presenten una major expressió de vies relacionades amb una major taxa metabòlica i un increment en la resposta inflamatòria enfront d'antígens exògens.

En conjunt, aquests resultats (en base a canvis en la seqüència i d'expressió de l'*MC1R*) ens farien arribar a la conclusió que altres loci estan implicats en la coloració d'aquestes espècies, com per exemple l'*agouti*. Se coneix que aquest gen està implicat en la síntesi de melanina i mutacions en la seva seqüència es relacionen amb variacions de coloració. Però al contrari del que passa amb l'*MC1R*, pocs estudis es coneixen en poblacions salvatges en aquest gen, i també cal remarcar que els canvis moleculars relacionats amb el color són diferents (posant en relació tant regions reguladores com codificants). La seva complexa estructura amb diversos introns intercalats entre els exons, dificulta la seva amplificació i posterior anàlisi. Actualment, les bases de dades no tenen registrades seqüències d'aquest gen dins la família *Lacertidae*; i les disponibles de l'ordre *Squamata*, són ARNm 'predicted' d'un *Anolis*, un *Gekko* i tres serps de diferents famílies. Estudis d'expressió amb el gen *agouti* s'han relacionat amb diferències de coloració en pollastres (Zhang *et al.* 2013, 2015), però pel contrari no s'ha

trobat relació en altres espècies com les ovelles (Peñagaricano *et al.* 2012). En el nostre cas es va intentar estudiar el gen a nivell genòmic i d'expressió sense aconseguir amplificar el gen en cap dels dos casos. Tal i com comenten Bradley *et al.* (2013), les causes que impossibilitaren amplificar l'ARNm no estan clares ja que hi ha diversos factors que hi intervenen: la seqüència dels *primers*, l'alineament, les condicions de la qPCR o la baixa expressió del gen.

Endemés del gen *agouti* implicat en el metabolisme de la melanina, la coloració en els animals pot relacionar-se amb altres tipus de pigments com carotenoides i pterines, encara que manca molta informació de les rutes metabòliques implicades i els seus mecanismes genètics (Hubbard *et al.* 2010). A més a més, els nous mètodes de seqüenciació massiva permetran obtenir molta informació de la qual es podran extreure noves dianes d'estudi per a esclarir la base del melanisme a les dues espècies endèmiques de les Illes Balears (*P. lilfordi* i *P. pityusensis*).

5. CONCLUSIONS

1. En relació a la genètica del melanisme podem afirmar que els canvis sinònims i no sinònims detectats en el gen *MC1R*, a les poblacions de les espècies endèmiques *P. lilfordi* i *P. pityusensis*, no estan correlacionats amb el fenotip melànic.
2. Els resultats ens indiquen que el melanisme no es pot considerar una característica ancestral, sinó que ha sorgit en diferents moments a les distintes poblacions de *Podarcis* de les Illes Balears, per tant, es tractaria d'una convergència evolutiva.
3. Les variacions en la seqüència de l'*MC1R* tampoc no es poden lligar a cap altra coloració (dorsal o ventral) present als individus estudiats.
4. A nivell d'expressió gènica no s'han observat canvis significatius en l'expressió del gen *MC1R*, mesurats mitjançant qPCR entre individus melànics i no melànics en les *Podarcis* endèmiques de les Illes Balears.
5. Mitjançant l'anàlisi completa de l'exoma hem detectat diferències d'expressió en distints gens entre els individus melànics i no melànics a *P. lilfordi* i *P. pityusensis*.
6. És interessant destacar que els individus melànics tenen: a) una major expressió de vies que estan implicades en la resposta inflamatòria (gen *antigen processing via MHC II*, *Wnt-protein binding* i *Wnt-activated receptor activity*); b) una major taxa metabòlica (pel fet de tenir una elevada activitat ATPasa, una major diferenciació de cèl·lules grasses i una major regulació en el transport de carbohidrats).
7. Per la seva banda, els individus no melànics mostren un increment en gens relacionats amb l'estrès.
8. S'ha implementat la seqüenciació de 6 exons nuclears corresponents als gens (*RAG1*, *MC1R*, *APOBE28*, *BLC9L*, *KIAA2018*, *KIF24*). La seva aplicació a la filogeografia de *P. tiliguerta* posa de relleu una gran diversitat intraespecífica, molt superior a la detectada en espècies properes com *P. lilfordi* o *P. pityusensis*.
9. El node originari de *P. tiliguerta* es pot datar en aproximadament 11,73 Ma. Posteriorment, s'ha evidenciat amb un fort suport estadístic una clara separació de les poblacions de Sardenya de les de Còrsega, datant-la en 9,66 Ma, la qual cosa concorda amb els resultats obtinguts amb l'ADNmt i dins el rang obtingut amb les datacions geològiques. Aquesta separació posa en evidència la necessitat d'una revisió taxonòmica per identificar els dos llinatges com a espècies diferenciades.



10. Dins cadascuna de les illes, les poblacions es troben estructurades en un mínim de dos grups principals. En relació a la variabilitat intrainular l'ADNmt defineix més grups que no pas l'ADNn.
11. Les poblacions insulars de *Podarcis* de les illes Columbretes, segons les anàlisis preliminars, formarien part de la nova espècie *Podarcis liolepis*, i es troben filogenèticament molt properes a les mostres procedents de Penyagolosa.
12. Podem concloure que l'estudi filogenètic a partir de 6 nuclears (*MC1R*, *RAG1*, *BLC9L*, *APOBE28*, *KIAA2018* i *KIF24*) és una bona eina molecular i juntament amb el mitocondrial ofereixen resultats més consistents.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, J., Canals, M., López-Martínez, J., Muñoz, A., Herranz, P., Urgeles, R., Palomo, C., Casamor, J.L., 2003. The Balearic Promontory geomorphology (Western Mediterranean): morphostructure and active processes. *Geomorphology* 49, 177-204.
- Advokaat, E.L., van Hinsbergen, D.J., Maffione, M., Langereis, C.G., Vissers, R.L., Cherchi, A., Schroeder, R., Madani, H., Columbu, S., 2014. Eocene rotation of Sardinia, and the paleogeography of the Western Mediterranean region. *Earth Planet Sci Lett* 401, 183-195.
- Alho, J.S., Herczeg, G., Söderman, F., Laurila, A., Jönsson, K.I., Merilä, J., 2010. Increasing melanism along a latitudinal gradient in a widespread amphibian: local adaptation, ontogenic or environmental plasticity? *BMC Evol Biol* 10, 317.
- Álvarez, W., 1972. Rotation of the Corsica-Sardinia microplate. *Nature* 235, 103-105.
- Álvarez, W., 1974. Fragmentation of the Alpine orogenic belt by microplate dispersal. *Nature* 248, 309-314.
- Amrine-Madsen, H., Koepfli, K.P., Wayne, R.K., Springer, M.S., 2003. A new phylogenetic marker, apolipoprotein B, provides compelling evidence for eutherian relationships. *Mol Phylogenet Evol* 28, 225-240.
- Anderson, T.M., vonHoldt, B.M., Candille, S.I., Musiani, M., Greco, C., Stahler, D.R., Smith, D.W., Padhukasahasram, B., Randi, E., Leonard, J.A., Bustamante, C.D., Ostrander, E.A., Tang, H., Wayne, R.K., Barsh, G.S., 2009. Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science* 323, 1339-1343.
- Aparicio, A., Mitjavila, J., Araña, V., Villa, I., 1991. La edad del volcanismo de las islas Columbretes Grande y Alborán (Mediterráneo occidental). *Bol Geol Min* 102, 562-570.
- Armstrong, M.H., Braun, E.L., Kimball, R.T., 2001. Phylogenetic utility of avian ovomucoid intron G: a comparison of nuclear and mitochondrial phylogenies in Galliformes. *The Auk* 118, 799-804.
- Arnold, E.N., 1973. Relationships of the Palearctic lizards assigned to the genera *Lacerta*, *Algyroides* and *Psammodromus* (Reptilia: Lacertidae). *Bull Br Mus Nat Hist Zool* 25, 292-366.
- Arnold, E.N., Oviden, D., 2002. Reptiles and amphibians of Europe. Princeton University Press Princeton, USA i Philippine Islands. 288 p.
- Arnold, E.N., Arribas, O., Carranza, S., 2007. Systematics of the Palearctic and Oriental lizard tribe Lacertini (squamata: Lacertidae: Lacertinae), with descriptions of eight new genera. *Zootaxa* 1430, 1-86.
- Avise, J.C., Bowen, B.W., 1994. Investigating sea turtle migration using DNA markers. *Curr Opin Genet Dev* 4, 882-886.
- Avise, J.C., 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol Ecol* 7, 371-379.



- Bagnara, J.T., Fernandez, P.J., Fujii, R., 2007. On the blue coloration of vertebrates. *Pigment Cell Res* 20, 14-26.
- Barbadillo, L.J., García-París, M., Sanchiz, B., 1997. Orígenes y relaciones evolutivas de la herpetofauna ibérica. Dins: J.M. Pleguezuelos (Ed.). *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*. Monografías de Herpetología. Asociación Herpetológica Española y Universidad de Granada 3, 47-100.
- Barbadillo, L.J., Lacomba, J.I., Pérez-Mellado, V., Sancho, V., López-Jurado, L.F., 1999. *Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias*. GeoPlaneta, Barcelona. 419 p.
- Barley, A.J., Spinks, P.Q., Thomson, R.C., Shaffer, H.B., 2010. Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtle tree of life. *Mol Phylogenet Evol* 55, 1189-1194.
- Barsh, G.S., 1996. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* 12, 299-305.
- Bellati, A., Pellitteri-Rosa, D., Sacchi, R., Nistri, A., Galimberti, A., Casiraghi, M., Fasola, M., Galeotti, P., 2011. Molecular survey of morphological subspecies reveals new mitochondrial lineages in *Podarcis muralis* (Squamata: Lacertidae) from the Tuscan Archipelago (Italy). *J Zool Syst Evol Res* 49, 240-250.
- Bermingham, E., Moritz, C., 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol Ecol* 7, 367-369.
- Birks, S.M., Edwards, S.V., 2002. A phylogeny of the megapodes (Aves: Megapodiidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 23, 408-421.
- Blondel, J., Aronson, J., 1999. *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. Oxford University Press, Oxford i Nova York. 328 p.
- Blondel, J., Aronson, J., Bodion, J.Y., Boeuf, G., 2010. *The Mediterranean region: biological diversity in space and time*. Oxford University Press, Oxford i Nova York. 392 p.
- Böhme, W., Pérez-Mellado, V., Cheylan, M., Nettmann, H.K., Krecsák, L., Sterijovski, B., Schmidt, B., Lymberakis, P., Podloucky, R., Sindaco, R., Avci, A., 2009. *Podarcis muralis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T61550A12514105.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T61550A12514105.en>
- Boscà, E., 1883. Exploración herpetológica de la isla de Ibiza. *Anales Soc Esp Hist Nat* 12, 241-250.
- Boscà, E., 1916. Dos observaciones a propósito de la *Lacerta muralis* en España. *Bol R Soc Española Hist Nat* 16, 327-330.
- Boulenger, G.A., 1905. A contribution to our knowledge of the varieties of the Wall-Lizard (*Lacerta muralis*) in Western Europe and North Africa. *Trans Zool Soc London* 17, 351-420.

- Bradley, B.J., Gerald, M.S., Widdig, A., Mundy, N.I., 2013. Coat Color Variation and Pigmentation Gene Expression in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *J Mamm Evol* 20, 263-270.
- Brizzi, R., Lanza, B., 1975. The natural history of the Macinaggio Islets (northeastern Corsica) with particular reference to their herpetofauna. *Natura* 66, 53-72.
- Brown, R.P., Pérez-Mellado, V., 1994. Ecological Energetics and Food Acquisition in Dense Menorcan Islet Populations of the Lizard *Podarcis lilfordi*. *Funct Ecol* 8, 427-434.
- 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. *Mol Phylogenet Evol* 48, 350-358.
- Brown, R.P., Yang, Z., 2010. Bayesian Dating of Shallow Phylogenies with a Relaxed Clock. *Syst Biol* 59, 119-131.
- Brown, R.P., Yang, Z., 2011. Rate variation and estimation of divergence times using strict and relaxed clocks. *BMC Evol Biol* 11, 1.
- Bruen, T.C., Philippe, H., Bryant, D., 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172, 2665-2681.
- Bruford, M.W., Wayne, R.K., 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr Opin Genet Dev* 3, 939-943.
- Bruschi, S., Corti, C., Carretero, M.A., Harris, D.J., Lanza, B., Leviton, A., 2006. Comments on the status of the Sardinian-Corsican Lacertid lizard *Podarcis tiliguerta*. *Proc Calif Acad Sci* 57, 225.
- Bruschi, S., Corti, C., Capula, M., 2010. *Podarcis tiliguerta* (Gmelin, 1789). Dins: C. Corti, M. Capula, L. Luiselli, E. Razzetti, R. Sindaco (Eds). *Fauna d'Italia. Reptilia. Edizioni Calderini de Il Sole, Editoria Specializzata S.r.l, Bologna. 869 p.*
- Buades, J.M., Rodríguez, V., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Brown, R.P., Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M.M., 2013. Variability of the *mc1r* gene in melanic and non-melanic *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis* from the Balearic Archipelago. *PLoS One* 8, e53088.
- Bultman, S.J., Michaud, E.J., Woychik, R.P., 1992. Molecular characterization of the mouse *agouti* locus. *Cell* 71, 1195-1204.
- Busack, S.D., Lawson, R., Arjo, W.M., 2005. Mitochondrial DNA, allozymes, morphology and historical biogeography in the *Podarcis vaucheri* (Lacertidae) species complex. *Amphibia-Reptilia* 26, 239-256.
- Calduch-Giner, J.A., Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Ballester-Lozano, G., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 2013. Deep sequencing for de novo construction of a marine fish (*Sparus aurata*) transcriptome database with a large coverage of protein-coding transcripts. *BMC Genomics* 14, 1-11.
- Capula, M., 1996. Evolutionary genetics of the insular lacertid lizard *Podarcis tiliguerta*: genetic structure and population heterogeneity in a geographically fragmented species. *Heredity* 77, 518-529.



- Carranza, S., Arnold, E.N., Thomas, R.H., Mateo, J., López-Jurado, L., 1999. Status of the extinct giant lacertid lizard *Gallotia simonyi simonyi* (Reptilia: Lacertidae) assessed using mtDNA sequences from museum specimens. *Herpetol J* 9, 83-86.
- Carretero, M.A., 2008. An integrated Assessment of a group with complex systematics: the Iberomaghrebian lizard genus *Podarcis* (Squamata, Lacertidae). *Integr Zool* 3, 247-266.
- Carretero, M.A., Galán, P., Salvador, A., 2015. Lagartija lusitana - *Podarcis guadarramae*. Dins: A. Salvador, A. Marco (Eds.). *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Carretero, M.A., Salvador, A., 2016. Lagartija verdosa - *Podarcis virescens*. Dins: A. Salvador, A. Marco (Eds.). *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Castilla, A.M., Bauwens, D., 1991. Observations on the natural history, present status, and conservation of the insular lizard *Podarcis hispanica atrata* on the Columbretes archipelago, Spain. *Biol Conserv* 58, 69-84.
- Castilla, A.M., Fernandez-Pedrosa, V., Backeljau, T., González, A., Latorre, A., Moya, A., 1998a. Conservation genetics of insular *Podarcis* lizards using partial cytochrome b sequences. *Mol Ecol* 7, 1407-1411.
- Castilla, A.M., Fernandez-Pedrosa, V., Harris, D.J., Gonzalez, A., Latorre, A., Moya, A., 1998b. Mitochondrial DNA divergence suggests that *Podarcis hispanica atrata* (Squamata: Lacertidae) from the Columbretes Islands merits specific distinction. *Copeia* 1998, 1037-1040.
- Castilla, A.M., 2000. Among-islet variation in color, morphological and scalation characters in *Podarcis atrata* from the Columbretes Archipelago, Mediterranean Sea. *J Herpetol* 34, 142-146.
- Castilla, A.M., Pastor, R., Verdugo, I., Escobar, J.V., Pons, G.X., 2005. Primeros datos sobre la ecología y comportamiento de las arañas *Argiope lobata* y *A. bruennichi* de una población reciente las islas Columbretes (Mediterráneo, España). First data on the ecology and behaviour of the orb-weaving spiders *Argiope lobata*. *Bolletí de la Societat d'Història Natural de les Balears* 48, 61-69.
- Castilla, A.M., Aguiló, M., Llacuna, G., Pérez, J., Kersting, D., 2006. Estudio del tamaño poblacional, evaluación del riesgo de extinción y elaboración de propuestas de conservación para la lagartija de columbretes (*Podarcis atrata*). Informe de la DGGMN de la Conselleria de Territorio y Vivienda de la Generalitat Valenciana.
- Castilla, A.M., Vanhooydonck, B., Catenazzi, A., 2008. Feeding behaviour of the Columbretes lizard *Podarcis atrata*, in relation to Isopoda (Crustaceae) species: *Ligia italica* and *Armadillo officinalis*. *Belg J Zool* 138, 146-148.
- Cavazza, W., Wezel, F.C., 2003. The Mediterranean region - A geological primer. *Episodes* 26, 160-168.

- Cerda-Reverter, J.M., Haitina, T., Schioth, H.B., Peter, R.E., 2005. Gene structure of the goldfish agouti-signaling protein: a putative role in the dorsal-ventral pigment pattern of fish. *Endocrinology* 146, 1597-1610.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9, 1657-1659.
- Cloudsley-Thompson, J.L., 1999. Multiple factors in the evolution of animal coloration. *Naturwissenschaften* 86, 123-132.
- Clusella-Trullas, S., 2006. Thermal ecology of melanistic and non-melanistic species of Cordylid lizards in the Western Cape of South Africa. Doctoral thesis. Drexel University, Philadelphia.
- Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Ben Rais Lasram, F., Aguzzi, J., Ballesteros, E., Bianchi, C.N., Corbera, J., Dailianis, T., Danovaro, R., Estrada, M., Frogliá, C., Galil, B.S., Gasol, J.M., Gertwagen, R., Gil, J., Guilhaumon, F., Kesner-Reyes, K., Kitsos, M.S., Koukouras, A., Lampadariou, N., Laxamana, E., López-Fé de la Cuadra, C.M., Lotze, H.K., Martin, D., Mouillot, D., Oro, D., Raicevich, S., Rius-Barile, J., Saiz-Salinas, J.I., San Vicente, C., Somot, S., Templado, J., Turon, X., Vafidis, D., Villanueva, R., Voultsiadou, E., 2010. The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. *PLoS One* 5, e11842.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Perol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21.
- Cooper, W., Greenberg, N., 1992. Reptilian coloration and behavior. *Biology of the Reptilia* 18, 298-422.
- Cooper, C.D., Raible, D.W., 2009. Mechanisms for reaching the differentiated state: Insights from neural crest-derived melanocytes. *Sem Cell Dev Biol* 105-110.
- Cooray, S.N., Clark, A.J., 2011. Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Mol Cell Endocrinol* 331, 215-221.
- Corander, J., Waldmann, P., Sillanpää, M.J., 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163, 367-374.
- Corander, J., Tang, J., 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Math Biosci* 205, 19-31.
- Corso, J., Gonçalves, G.L., de Freitas, T.R.O., 2012. Sequence variation in the melanocortin-1 receptor (*MC1R*) pigmentation gene and its role in the cryptic coloration of two South American sand lizards. *Genet Mol Biol* 35, 81-87.
- Corti, C., Lo Cascio, P., 1999. *Lacertidi italiani*. L'epos, Palermo.
- Corti, C., Lo Cascio, P.L., 2002. *The lizards of Italy and adjacent areas*. Edition Chimaira, Frankfurt.
- Crisci, J.V., Sala, O.E., Katinas, L., Posadas, P., 2006. Bridging historical and ecological approaches in biogeography. *Austral Syst Bot* 19, 1-10.



- Daniels, S.R., Mouton, P., Du Toit, D.A., 2004. Molecular data suggest that melanistic ectotherms at the south-western tip of Africa are the products of Miocene climatic events: evidence from cordylid lizards. *J Zool* 263, 373-383.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Meth* 9, 772-772.
- Davis, S., Heywood, V., Hamilton, A., 1994. Europe, Africa, South West Asia and the Middle East. International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources, Cambridge.
- DeBry, R.W., Seshadri, S., 2001. Nuclear intron sequences for phylogenetics of closely related mammals: an example using the phylogeny of *Mus*. *J Mammal* 82, 280-288.
- Dessinioti, C., Antoniou, C., Katsambas, A., Stratigos, A.J., 2011. Melanocortin 1 Receptor Variants: Functional Role and Pigmentary Associations. *Photochem Photobiol* 87, 978-987.
- Diego-Rasilla, F.J., Pérez-Mellado, V., 2003. Home range and habitat selection by *Podarcis hispanica* (Squamata, Lacertidae) in Western Spain. *Folia Zool (Praha)* 52, 87-98.
- Diego-Rasilla, F.J., Salvador, A., 2015. Lagartija roquera - *Podarcis muralis* (Laurenti, 1768). Dins: A. Salvador, A. Marco (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Dinulescu, D.M., Cone, R.D., 2000. Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts. *J Biol Chem* 275, 6695-6698.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29, 1969-1973.
- Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M., Yaroslavtseva, O.N., Greig, C., Kryukov, V.Y., Grizanova, E.V., Mukherjee, K., Vilcinskas, A., Glupov, V.V., Butt, T.M., 2013. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? *PLoS One* 8, e60248.
- Ducrest, A.L., Keller, L., Roulin, A., 2008. Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. *Trends Ecol Evol* 23, 502-510.
- Ducrest, A.L., Ursenbacher, S., Golay, P., Monney, J.C., Mebert, K., Roulin, A., Dubey, S., 2014. Pro-opiomelanocortin gene and melanin-based colour polymorphism in a reptile. *Biol J Linn Soc* 111, 160-168.
- Duggen, S., Hoernle, K., Van Den Bogaard, P., Rüpke, L., Morgan, J.P., 2003. Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature* 422, 602-606.
- Eisentraut, M., 1949. Die Eidechsen der spanische Mittelmeerinseln und ihre Rassenaufspaltung im Lichte der Evolution. *Mitt Zool Mus Berlin* 26, 1-225.
- Eisentraut, M., 1954. Der inselmelanismus der Eidechsen und seine Entstehung im Streit der Meinungen. *Zool Anz* 152, 317-321.
- Emig, C.C., Geistdoerfer, P., 2004. Faune profonde en Mer Méditerranée: les échanges historiques, géographiques et bathymétriques. *Carnets Geol* 4, 1-10.

- Everts, R.E., Rothuizen, J., van Oost, B.A., 2000. Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (*MC1R*) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour. *Anim Genet* 31, 194-199.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1, 47-50.
- Ezard, T., Fujisawa, T., Barraclough, T., 2009. SPLITS: species' limits by threshold statistics. R package version 1.
- Fan, R., Dong, Y., Cao, J., Bai, R., Zhu, Z., Li, P., Zhang, J., He, X., Lü, L., Yao, J., Mondal, M., Smith, G.W., Dong, C., 2011. Gene expression profile in white alpaca (*Vicugna pacos*) skin. *Animal* 5, 1157-1161.
- Fan, R., Xie, J., Bai, J., Wang, H., Tian, X., Bai, R., Jia, X., Yang, L., Song, Y., Herrid, M., Gao, W., He, X., Yao, J., Smith, G.W., Dong, C., 2013. Skin transcriptome profiles associated with coat color in sheep. *BMC Genomics* 14, 1-12.
- Fay, J.C., Wu, C.I., 2000. Hitchhiking under positive Darwinian selection. *Genetics* 155, 1405-1413.
- Fernández-Palacios, J.M., 2010. Why islands. *Islands and evolution*, 85-109.
- Fleige, S., Pfaffl, M.W., 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27, 126-139.
- Folmer, O., Hoeh, W., Black, M., Vrijenhoek, R., 1994. Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3, 294-299.
- Fontanesi, L., Beretti, F., Riggio, V., Dall'Olio, S., Gonzalez, E.G., Finocchiaro, R., Davoli, R., Russo, V., Portolano, B., 2009. Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene of different goat breeds: association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences. *BMC Genet* 10, 47.
- Fu, J., 2000. Toward the phylogeny of the family Lacertidae – Why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biol J Linn Soc* 71, 203-217.
- Fu, Y.X., Li, W.H., 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Fujisawa, T., Barraclough, T.G., 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Syst Biol* 62, 707-724.
- Fulgione, D., Lega, C., Trapanese, M., Buglione, M., 2015. Genetic factors implied in melanin-based coloration of the Italian wall lizard. *J Zool* 296, 278-285.



- Gabirot, M., López, P., Martín, J., 2014. Microgeographical variations in coloration of male Iberian wall lizards may be related to habitat and climatic conditions. *Adv Zool* 2014, ID 809285, 1-11.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol Ecol* 18, 4541-4550.
- García-Borrón, J.C., Sanchez-Laorden, B.L., Jimenez-Cervantes, C., 2005. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 18, 393-410.
- García-Porta, J., Simó-Riudalbas, M., Robinson, M., Carranza, S., 2017. Diversification in arid mountains: biogeography and cryptic diversity of *Pristurus rupestris rupestris* in Arabia. *J Biogeogr*, n/a-n/a.
- García-Ruiz, J.M., Nadal-Romero, E., Lana-Renault, N., Beguería, S., 2013. Erosion in Mediterranean landscapes: changes and future challenges. *Geomorphology* 198, 20-36.
- Gassert, F., Schulte, U., Husemann, M., Ulrich, W., Rödder, D., Hochkirch, A., Engel, E., Meyer, J., Habel, J.C., 2013. From southern refugia to the northern range margin: genetic population structure of the common wall lizard, *Podarcis muralis*. *J Biogeogr* 40, 1475-1489.
- Geniez, P., Cluchier, A., Sá-Sousa, P., Guillaume, C.P., Crochet, P.A., 2007. Systematics of the *Podarcis hispanicus*-complex (Sauria, Lacertidae) I: Redefinition, morphology and distribution of the nominotypical taxon. *Herpetol J* 17, 69-80.
- Geniez, P., Sá-Sousa, P., Guillaume, C.P., Cluchier, A., Crochet, P.A., 2014. Systematics of the *Podarcis hispanicus* complex (Sauria, Lacertidae) III: valid nomina of the western and central Iberian forms. *Zootaxa* 3794, 1-51.
- Gmelin, J.F., 1789. *Caroli a Linné, Systema naturae per regna tria natura: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, Locis. Part 3: Amphibia und Pisces. Editio XIII, aucta, reformata. Lipsiae: impensis G. E. Beer. 1, 1033-1516.*
- Godinho, R., Crespo, E., Ferrand, N., 2008. The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in a highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Mol Ecol* 17, 4670-4683.
- González, P., Pinto, F., Nogales, M., Jimenez-Asensio, J., Hernandez, M., Cabrera, V.M., 1996. Phylogenetic relationships of the Canary Islands endemic lizard genus *Gallotia* (Sauria: Lacertidae), inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 6, 63-71.
- Grether, G.F., Kolluru, G.R., Nersissian, K., 2004. Individual colour patches as multicomponent signals. *Biol Rev* 79, 583-610.
- Grill, A., Casula, P., Lecis, R., Menken, S., 2007. Endemism in Sardinia. *Dins: S. Weiss, N. Ferrand (Eds.). Phylogeography of Southern European refugia. Springer, Netherlands, 273-296.*

- Gross, J.B., Borowsky, R., Tabin, C.J., 2009. A novel role for *Mc1r* in the parallel evolution of depigmentation in independent populations of the cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS Genetics* 5, e1000326.
- Gueguen, E., Doglioni, C., Fernandez, M., 1998. On the post-25 Ma geodynamic evolution of the western Mediterranean. *Tectonophysics* 298, 259-269.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52, 696-704.
- Günther, A., 1874. Description of a new European species of *Zootoca*. *Ann Mag Nat Hist* 14, 158-159.
- Guo, X.L., Li, X.L., Li, Y., Gu, Z.L., Zheng, C.S., Wei, Z.H., Wang, J.S., Zhou, R.Y., Li, L.H., Zheng, H.Q., 2010. Genetic variation of chicken *MC1R* gene in different plumage colour populations. *Br Poult Sci* 51, 734-739.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Han, J.I., Yang, H., Jeung, E.B., Na, K.J., 2012. Altered expression of melanocortin-1 receptor (*MC1R*) in a yellow-coloured wild raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). *Vet Dermatol* 23, 187-e137.
- Hare, M.P., 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends Ecol Evol* 16, 700-706.
- Harris, D.J., Arnold, E.N., 1999. Relationships of Wall Lizards, *Podarcis* (Reptilia: Lacertidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Copeia* 1999, 749-754.
- Harris, D.J., Sá-Sousa, P., 2001. Species distinction and relationships of the western Iberian *Podarcis* lizards (Reptilia, Lacertidae) based on morphology and mitochondrial DNA sequences. *Herpetol J* 11, 129-136.
- Harris, D.J., Carranza, S., Arnold, E.N., Pinho, C., Ferrand, N., 2002. Complex biogeographical distribution of genetic variation within *Podarcis* wall lizards across the Strait of Gibraltar. *J Biogeogr* 29, 1257-1262.
- Harris, D.J., Sá-Sousa, P., 2002. Molecular Phylogenetics of Iberian Wall Lizards (*Podarcis*): Is *Podarcis hispanica* a Species Complex? *Mol Phylogenet Evol* 23, 75-81.
- Harris, D.J., Pinho, C., Carretero, M.A., Corti, C., Böhme, W., 2005. Determination of genetic diversity within the insular lizard *Podarcis tiliguerta* using mtDNA sequence data, with a reassessment of the phylogeny of *Podarcis*. *Amphibia-Reptilia* 26, 401-407.
- Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol* 4, 6-11.
- Hartmann, M., 1953. Die Rassenaufspaltung der Blearischeninsel Eidechsen. *Zool Jb Phys* 64, 86-96.
- Hasbun, C.R., Gomez, A., Köhler, G., Lunt, D.H., 2005. Mitochondrial DNA phylogeography of the Mesoamerican spiny-tailed lizards (*Ctenosaura*



- quinquecarinata* complex): historical biogeography, species status and conservation. *Mol Ecol* 14, 3095-3107.
- Heled, J., Drummond, A.J., 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Mol Biol Evol* 27, 570-580.
- Heled, J., Drummond, A.J., 2012. Calibrated Tree Priors for Relaxed Phylogenetics and Divergence Time Estimation. *Syst Biol* 61, 138-149.
- Henning, F., Renz, A.J., Fukamachi, S., Meyer, A., 2010. Genetic, comparative genomic, and expression analyses of the *Mc1r* locus in the polychromatic Midas cichlid fish (Teleostei, Cichlidae *Amphilophus* sp.) species group. *J Mol Evol* 70, 405-412.
- Herczeg, G., Matsuba, C., Merilä, J., 2010. Sequence variation in the melanocortin-1 receptor gene (*Mc1r*) does not explain variation in the degree of melanism in a widespread amphibian. *Ann Zool Fennici* 47, 37-45.
- Hoekstra, H.E., Nachman, M.W., 2003. Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice. *Mol Ecol* 12, 1185-1194.
- Hoekstra, H.E., 2006. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97, 222-234.
- Hofrichter, R., 2004. *El mar Mediterráneo: fauna, flora, ecología*. Ed. Omega, Barcelona.
- Hofreiter, M., Schoneberg, T., 2010. The genetic and evolutionary basis of colour variation in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 67, 2591-2603.
- Howarth, D.G., Baum, D.A., 2002. Phylogenetic utility of a nuclear intron from nitrate reductase for the study of closely related plant species. *Mol Phylogenet Evol* 23, 525-528.
- Hsü, K.J., Montadert, L., Bernoulli, D., Cita, M.B., Erickson, A., Garrison, R.E., Kidd, R.B., Mèlierés, F., Müller, C., Wright, R., 1977. History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* 267, 399-403.
- Hubbard, J.K., Uy, J.A.C., Hauber, M.E., Hoekstra, H.E., Safran, R.J., 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends Genet* 26, 231-239.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6, 279-284.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol Biol Evol* 23, 254-267.
- Igea, J., Juste, J., Castresana, J., 2010. Novel intron markers to study the phylogeny of closely related mammalian species. *BMC Evol Biol* 10, 369.
- Ishikawa, H., 1977. Evolution of ribosomal RNA. *Comp Biochem Physiol B* 58, 1-7.
- Ito, S., Wakamatsu, K., 2010. Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24, 63-74.

- Juan, A., Crespo, M., Cowan, R., Lexer, C., Fay, M., 2004. Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the Western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Mol Ecol* 13, 2679-2690.
- Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Llorente, G.A., 2012. Morphology of the *Podarcis* wall lizards (Squamata: Lacertidae) from the Iberian Peninsula and North Africa: patterns of variation in a putative cryptic species complex. *Zool J Linn Soc* 164, 173-193.
- Kerje, S., Lind, J., Schutz, K., Jensen, P., Andersson, L., 2003. Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) mutations are associated with plumage colour in chicken. *Anim Genet* 34, 241-248.
- Kijas, J.M.H., Wales, R., Törnsten, A., Chardon, P., Moller, M., Andersson, L., 1998. Melanocortin Receptor 1 (*MC1R*) Mutations and Coat Color in Pigs. *Genetics* 150, 1177-1185.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L., 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14, 1-13.
- Kingsley, E.P., Manceau, M., Wiley, C.D., Hoekstra, H.E., 2009. Melanism in *Peromyscus* is caused by independent mutations in agouti. *PLoS One* 4, e6435.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 6196-6200.
- Kramer, G., 1949. Über Inselmelanismus bei Eidechsen. *Z Indukt Abstamm Ver* 83, 157-164.
- Krijgsman, W., Hilgen, F., Raffi, I., Sierro, F., Wilson, D., 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400, 652-655.
- Krijgsman, W., 2002. The Mediterranean: Mare Nostrum of Earth sciences. *Earth Planet Sci Lett* 205, 1-12.
- Kronforst, M.R., Barsh, G.S., Kopp, A., Mallet, J., Monteiro, A., Mullen, S.P., Protas, M., Rosenblum, E.B., Schneider, C.J., Hoekstra, H.E., 2012. Unraveling the thread of nature's tapestry: the genetics of diversity and convergence in animal pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 25, 411-433.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.
- Kuriyama, T., Misawa, H., Miyaji, K., Sugimoto, M., Hasegawa, M., 2013. Pigment cell mechanisms underlying dorsal color-pattern polymorphism in the Japanese four-lined snake. *J Morphol* 274, 1353-1364.
- Kuriyama, T., Okamoto, T., Miyaji, K., Hasegawa, M., 2016. Iridophore-and Xanthophore-Deficient Melanistic Color Variant of the Lizard *Plestiodon latiscutatus*. *Herpetologica* 72, 189-195.



- Kwon, H.Y., Bultman, S.J., Loffler, C., Chen, W.J., Furdon, P.J., Powell, J.G., Usala, A.L., Wilkison, W., Hansmann, I., Woychik, R.P., 1994. Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the *agouti* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9760-9764.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Mol Biol Evol* 29, 1695-1701.
- Lanza, B., 1972. The natural history of the Cerbicale islands (south-eastern Corsica) with particular reference to their herpetofauna. *Storia naturale delle Isole Cerbicale (Corsica sudorientale) con particolare riferimento alla loro erpetifauna*. *Natura* 63, 345-407.
- Lanza, B., Brizzi, R., 1974. On two new Corsican microinsular subspecies of *Podarcis tiliguerta* (Gmelin, 1789)(Reptilia: Lacertidae). *Natura* 65, 155-193.
- Lanza, B., 1976. On a new wall lizard from Corsica, with notes on the Sanguinarie Islands (Reptilia: Lacertidae). *Natura* 67, 185-202.
- Lanza, B., Poggesi, M., 1986. *Storia naturale delle isole satelliti della Corsica*. Istituto geografico militare, Firenze.
- Lanza, B., Corti, C., 1996. Evolution of the knowledge on the Italian herpetofauna during the 20th century. *Bollettino del museo civico di storia naturale di Verona* 20, 373-436.
- Laurenti, J.N., 1768. *Specimen medicum, exhibens synopsis reptilium emendatam cum experimentis circa venena et antidota reptilium austriacorum*. J.T.N. de Trattner, Viennae. 214 p.
- Lessa, E.P., 1992. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Mol Biol Evol* 9, 323-330.
- Li, X.L., Zhao, J.W., Tang, C.J., Zhou, R.Y., Zheng, G., Li, L.H., Guo, X.L., 2010. Sequencing of Part of the Goat agouti Gene and SNP Identification. *Bioch Genet* 48, 152-156.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lindgren, J., Sjövall, P., Carney, R.M., Uvdal, P., Gren, J.A., Dyke, G., Schultz, B.P., Shawkey, M.D., Barnes, K.R., Polcyn, M.J., 2014. Skin pigmentation provides evidence of convergent melanism in extinct marine reptiles. *Nature* 506, 484-488.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402-408.
- Lozano, J., Solano, F., 1989. Bioquímica de la pigmentación en mamíferos. *Investig Cienc* 157, 87-93.
- Macey, J.R., Schulte, J.A., Ananjeva, N.B., Larson, A., Rastegar-Pouyani, N., Shammakov, S. M., Papenfuss, T. J., 1998. Phylogenetic Relationships among

- Agamid lizards of the *Laudakia caucasia* species group: testing hypotheses of biogeographic fragmentation and an area cladogram for the Iranian Plateau. *Mol Phylogenet Evol* 10, 118-131.
- Magri, D., Vendramin, G.G., Comps, B., Dupanloup, I., Geburek, T., Gömöry, D., Latałowa, M., Litt, T., Paule, L., Roure, J.M., 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171, 199-221.
- Majerus, M.E., 1998. *Melanism: evolution in action*. Oxford University Press, Oxford. 388 p.
- Majerus, M.E., Mundy, N.I., 2003. Mammalian melanism: natural selection in black and white. *Trends Genet* 19, 585-588.
- Manceau, M., Domingues, V.S., Linnen, C.R., Rosenblum, E.B., Hoekstra, H.E., 2010. Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 2439-2450.
- Mannion, A., 1997. Climate and vegetation. Dins: R. Thompson, A. Perry (Eds.), *Applied Climatology: Principles and Practice*. Routledge, London, 123-140.
- Mannion, A., 1999. Domestication and the origins of agriculture: an appraisal. *Prog in Phys Geogr* 23, 37-56.
- Mannion, A.M., Vogiatzakis, I.N., 2007. Island landscape dynamics: examples from the Mediterranean. *Geographical paper n. 183*, UK.
- Manolopoulou, I., Legarreta, L., Emerson, B.C., Brooks, S., Tavaré, S., 2011. A Bayesian approach to phylogeographic clustering. *Interface focus*, rsfs20110054.
- Manolopoulou, I., Emerson, B.C., 2012. Phylogeographic ancestral inference using the coalescent model on haplotype trees. *J Comput Biol* 19, 745-755.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet* 17, 10.
- Martínez-Solano, I., Gonçalves, H., Arntzen, J., García-París, M., 2004. Phylogenetic relationships and biogeography of midwife toads (*Discoglossidae: Alytes*). *J Biogeogr* 31, 603-618.
- Martín-Vallejo, J., García-Fernández, J., Pérez-Mellado, V., Vicente-Villardón, J., 1995. Habitat selection and thermal ecology of the sympatric lizards *Podarcis muralis* and *Podarcis hispanica* in a mountain region of central Spain. *Herpetol J* 5, 181-188.
- Mateo-Miras, J.A., Cheylan, M., Nourira, M.S., Joger, U., Sá-Sousa, P., Pérez-Mellado, V., Martínez-Solano, I., 2009. *Podarcis hispanicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e. T61548A12513281.
- Matthee, C.A., Eick, G., Willows-Munro, S., Montgelard, C., Pardini, A.T., Robinson, T.J., 2007. Indel evolution of mammalian introns and the utility of non-coding nuclear markers in eutherian phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol* 42, 827-837.



- Mayer, W., Pavlicev, M., 2007. The phylogeny of the family Lacertidae (Reptilia) based on nuclear DNA sequences: Convergent adaptations to arid habitats within the subfamily Eremiainae. *Mol Phylogenet Evol* 44, 1155-1163.
- McRobie, H., Thomas, A., Kelly, J., 2009. The genetic basis of melanism in the gray squirrel (*Sciurus carolinensis*). *J Hered* 100, 709-714.
- Médail, F., Quézel, P., 1997. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Ann Missouri Bot Gard* 84, 112-127.
- Médail, F., Quézel, P., 1999. Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. *Conserv Biol* 13, 1510-1513.
- Meulenkamp, J.E., Sissingh, W., 2003. Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African–Eurasian convergent plate boundary zone. *Palaeogeog palaeoclim palaeoecol* 196, 209-228.
- Micheletti, S., Parra, E., Routman, E.J., 2012. Adaptive color polymorphism and unusually high local genetic diversity in the side-blotched Lizard, *Uta stansburiana*. *PLoS One* 7: e47694.
- Mills, M.G., Patterson, L.B., 2009. Not just black and white: pigment pattern development and evolution in vertebrates. *Sem Cell Dev Biol* 20, 72-81.
- Morey, M., Ruiz-Pérez, M., 2008. The Balearic Islands. *Dins: I.N. Vogiatzakis, G. Pungetti, A.M. Mannion (Eds.). Mediterranean Island Landscapes. Springer, Netherlands, 271-296.*
- Muhagheh-Dolatabady, M., Habibizad, J., 2014. Sequence characterization of promoter region at the melanocortin-1 receptor (*MC1R*) gene in karakul sheep breed. *J Agric Sci Technol* 16, 551-560.
- Mulcahy, D.G., Noonan, B.P., Moss, T., Townsend, T.M., Reeder, T.W., Sites, J.W., Wiens, J.J., 2012. Estimating divergence dates and evaluating dating methods using phylogenomic and mitochondrial data in squamate reptiles. *Mol Phylogenet Evol* 65, 974-991.
- Mundy, N.I., 2005. A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proc Biol Sci* 272, 1633-1640.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- Nachman, M.W., Hoekstra, H.E., D'Agostino, S.L., 2003. The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5268-5273.
- Nachman, M.W., 2005. The genetic basis of adaptation: lessons from concealing coloration in pocket mice. *Genetica* 123, 125-136.
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3, 418-426.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. Iq-tree: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32, 268-274.

- Nunes, V.L., Miraldo, A., Beaumont, M.A., Butlin, R.K., Paulo, O.S., 2011. Association of *Mc1r* variants with ecologically relevant phenotypes in the European ocellated lizard, *Lacerta lepida*. *J Evol Biol* 24, 2289-2298.
- Oliverio, M., Bologna, M.A., Monciotti, A., Annesi, F., Mariottini, P., 1998. Molecular phylogenetics of the Italian *Podarcis lizards* (Reptilia, Lacertidae). *Ital J Zool* 65, 315-324.
- Oliverio, M., Bologna, M.A., Mariottini, P., 2000. Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis Wagler*, 1830 and *Teira Gray*, 1838 (Reptilia, Lacertidae). *J Biogeogr* 27, 1403-1420.
- Olsson, M., Stuart-Fox, D., Ballen, C., 2013. Genetics and evolution of colour patterns in reptiles. *Sem Cell Dev Biol* 24, 529-541.
- Ortega, J., López, P., Martín, J., 2014. Conspicuous blue tails, dorsal pattern morphs and escape behaviour in hatchling Iberian wall lizards (*Podarcis hispanicus*). *Biol J Linn Soc* 113, 1094-1106.
- Ortega, J., Pellitteri-Rosa, D., López, P., Martín, J., 2015. Dorsal pattern polymorphism in female Iberian wall lizards: differences in morphology, dorsal coloration, immune response, and reproductive investment. *Biol J Linn Soc* 116, 352-363.
- Oppel, M., 1811. Ordnungen, Familien und Gattungen der Reptilien als Prodrum einer Naturgeschichte derselben. J Lindauer, Munchen. 87 p.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. Dins: D.M. Hillis, C. Moritz, B.K. Mable (Eds.), *Molecular Systematics*. Sunderland, 205-247.
- Parker, A.R., 1998. The diversity and implications of animal structural colours. *J Exp Biol* 201, 2343-2347.
- Patwardhan, A., Ray, S., Roy, A., 2014. Molecular markers in phylogenetic studies: A Review. *J Phylogen Evol Biol* 2, 131.
- Peñagaricano, F., Zorrilla, P., Naya, H., Robello, C., Urioste, J.I., 2012. Gene expression analysis identifies new candidate genes associated with the development of black skin spots in Corriedale sheep. *J Appl Genet* 53, 99-106.
- Pérez-Mellado, V., 1988. *Podarcis pityusensis* (Boscà, 1883). Dins: A. Salvador (Ed.), *Reptiles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, 294-302.
- Pérez-Mellado, V., Salvador, A., 1988. The Balearic lizard, *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874) of Menorca. *Arquiv Mus Bocage. Nova serie* 1, 127-195.
- Pérez-Mellado, V., 1998a. *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874). Dins: A. Salvador (Ed.), *Reptiles, Fauna Ibérica*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, 10, 272-282.
- Pérez-Mellado, V., 1998b. *Podarcis hispanica* (Steindachner, 1870). Dins: A. Salvador (Ed.), *Reptiles, Fauna Ibérica*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, 10, 258-272.
- Pérez-Mellado, V., 2004. *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874) Lagartija balear. Dins: Atlas y libro de rojo de los anfibios y reptiles de España. Dirección General de la Naturaleza. Asociación Herpetológica Española, Madrid, 248-250.



- Pérez-Mellado, V., 2005. Amfibis i Rèptils. Dins: J.M. Vidal Hernández (Ed.), Enciclopedia de Menorca. Tom V-Vertebrats-Volum 2: Peixos, amfibis i rèptils. Obra Cultural de Menorca, Maó, 117-227.
- Pérez-Mellado, V., Hernández-Estévez, J.A., 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, 49-60.
- Pérez Mellado, V., 2009. Les sargantanes de les Balears. Documenta Balear, Palma. 96 p.
- Pérez-Novo, C.A., Claeys, C., Speleman, F., Van Cauwenberge, P., Bachert, C., Vandensompele, J., 2005. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques* 39, 52-56.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26.
- Pfaffl, M.W., 2006. Relative quantification. *Real-time PCR* 63, 63-82.
- Pierre, C., Caruso, A., Blanc-Valleron, M.M., Rouchy, J.M., Orzsag-Sperber, F., 2006. Reconstruction of the paleoenvironmental changes around the Miocene-Pliocene boundary along a West-East transect across the Mediterranean. *Sediment Geol* 188, 319-340.
- Pinho, C., Corti, C., Carretero, M.A., Harris, D.J., 2004. Genetic variability within *Podarcis tiliguerta*: preliminary evidence from 12s rRNA gene sequences, Fifth International Symposium on the Lacertids of the Mediterranean Basin, Lipari, Aeolian Islands, Sicily, Italy, 7-11.
- Pinho, C., Ferrand, N., Harris, D.J., 2006. Reexamination of the Iberian and North African *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) phylogeny based on increased mitochondrial DNA sequencing. *Mol Phylogenet Evol* 38, 266-273.
- Pinho, C., Harris, D.J., Ferrand, N., 2007. Contrasting patterns of population subdivision and historical demography in three western Mediterranean lizard species inferred from mitochondrial DNA variation. *Mol Ecol* 16, 1191-1205.
- Pinho, C., Harris, D.J., Ferrand, N., 2008. Non-equilibrium estimates of gene flow inferred from nuclear genealogies suggest that Iberian and North African wall lizards (*Podarcis* spp.) are an assemblage of incipient species. *BMC Evol Biol* 8, 63.
- Pinho, C., Rocha, S., Carvalho, B., Lopes, S., Mourão, S., Vallinoto, M., Brunes, T.O., Haddad, C.F.B., Gonçalves, H., Sequeira, F., Ferrand, N., 2010. New primers for the amplification and sequencing of nuclear loci in a taxonomically wide set of reptiles and amphibians. *Conserv Genet Resour* 2, 181-185.

- Pleguezuelos, J.M., Fahd, S., Carranza, S., 2008. El papel del Estrecho en la conformación de la actual fauna de anfibios y reptiles del Mediterráneo Occidental. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 19, 2-17.
- Podnar, M., Mayer, W., 2005. Can mitochondrial DNA draw the phylogenetic picture of Central Mediterranean island *Podarcis*? *Herpetozoa* 18, 73-77.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D., Vogler, A.P., 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst Biol* 55, 595-609.
- Portik, D., Wood, P., Grismer, J., Stanley, E., Jackman, T., 2012. Identification of 104 rapidly-evolving nuclear protein-coding markers for amplification across scaled reptiles using genomic resources. *Conserv Genet Resour* 4, 1-10.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253-1256.
- Posadas, P., Crisci, J.V., Katinas, L., 2006. Historical biogeography: A review of its basic concepts and critical issues. *J Arid Environ* 66, 389-403.
- Poulakakis, N., Lymberakis, P., Antoniou, A., Chalkia, D., Zouros, E., Mylonas, M., Valakos, E., 2003. Molecular phylogeny and biogeography of the wall-lizard *Podarcis erhardii* (Squamata: Lacertidae). *Mol Phylogenet Evol* 28, 38-46.
- Protas, M.E., Patel, N.H., 2008. Evolution of coloration patterns. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 425-446.
- Pyron, R.A., Burbrink, F.T., Wiens, J.J., 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol Biol* 13, 93.
- Raia, P., Guarino, F.M., Turano, M., Polese, G., Rippa, D., Carotenuto, F., Monti, D.M., Cardi, M., Fulgione, D., 2010. The blue lizard spandrel and the island syndrome. *BMC Evol Biol* 10, 289.
- Rambaut, A., Drummond, A., 2007. Tracer 1.5. University of Edinburgh, Edinburgh. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- Rannala, B., Yang, Z., 2013. Improved reversible jump algorithms for Bayesian species delimitation. *Genetics* 194, 245-253.
- Renoult, J.P., Geniez, P., Bacquet, P., Benoit, L., Crochet, P.A., 2009. Morphology and nuclear markers reveal extensive mitochondrial introgressions in the Iberian Wall Lizard species complex. *Mol Ecol* 18, 4298-4315.
- Renoult, J.P., Geniez, P., Bacquet, P., Guillaume, C.P., Crochet, P.A., 2010. Systematics of the *Podarcis hispanicus*-complex (Sauria, Lacertidae) II: the valid name of the north-eastern Spanish form. *Zootaxa* 2500, 58-68.
- Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Roselli-Rehfuss, L., Baack, E., Mountjoy, K.G., Cone, R.D., 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-834.



- Roca, V., 2016. Nematodos parásitos intestinales de *Podarcis liolepis* en las Islas Columbretes. Boletín de la Asociación Herpetológica Española 27, 3-6.
- Rodríguez, V., Brown, R.P., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M.M., 2013. Multilocus genetic diversity and historical biogeography of the endemic wall lizard from Ibiza and Formentera, *Podarcis pityusensis* (Squamata: Lacertidae). Mol Ecol 22, 4829-4841.
- Rodríguez, V., Brown, R., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Picornell, A., Castro, J., Ramon, C., 2014. Genetic diversity and historical biogeography of the Maltese wall lizard, *Podarcis filfolensis* (Squamata: Lacertidae). Conserv Genet 15, 295-304.
- Rodríguez, V., Buades, J.M., Brown, R.P., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Corti, C., Delaugerre, M., Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M.M., 2017. Evolutionary history of *Podarcis tiliguerta* on Corsica and Sardinia. BMC Evol Biol 17, 27.
- Rosenbaum, G., Lister, G., Duboz, C., 2002. Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. J Virtual Explorer 8, 107-130.
- Rosenblum, E.B., Hoekstra, H.E., Nachman, M.W., 2004. Adaptive reptile color variation and the evolution of the *MC1R* gene. Evolution 58, 1794-1808.
- Rosenblum, E.B., Rompler, H., Schoneberg, T., Hoekstra, H.E., 2010. Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. Proc Natl Acad Sci USA 107, 2113-2117.
- Rosenzweig, M.L., 1995. Species diversity in space and time. Cambridge University Press, Cambridge. 460 p.
- Roulin, A., Gasparini, J., Bize, P., Ritschard, M., Richner, H., 2008. Melanin-based colorations signal strategies to cope with poor and rich environments. Behav Evol Sociobiol 62, 507-519.
- Roulin, A., Ducrest, A.L., 2013. Genetics of colouration in birds. Sem Cell Dev Biol 24, 594-608.
- Roulin, A., Mafli, A., Wakamatsu, K., 2013. Reptiles produce pheomelanin: evidence in the Eastern Hermann's Tortoise (*Eurotestudo boettgeri*). J Herpetol 47, 258-261.
- Roulin, A., 2016. Condition-dependence, pleiotropy and the handicap principle of sexual selection in melanin-based colouration. Biol Rev 91, 328-348.
- Saenko, S.V., Teyssier, J., van der Marel, D., Milinkovitch, M.C., 2013. Precise colocalization of interacting structural and pigmentary elements generates extensive color pattern variation in *Phelsuma* lizards. BMC Biol 11, 1-13.
- Saint, K.M., Austin, C.C., Donnellan, S.C., Hutchinson, M.N., 1998. *C-mos*, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. Mol Phylogenet Evol 10, 259-263.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4, 406-425.

- Salvador, A., Pérez-Mellado, V., 1984. The Amphibians and Reptiles of the Pytiusic Islands. Dins: K. Khubièr, J.A. Alcover, G.C. d'Arellano-Tur (Eds). Biogeography and Ecology of the Pityusic Islands. The Hague. Dr. W. Junk Publishers 429-439.
- Salvador, A., 2009. Lagartija de las Pitiusas - *Podarcis pityusensis*. Dins: A. Salvador, A. Marco (Eds.), Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Salvador, A., Carretero, M.A., 2014. *Podarcis hispanicus* (Steindachner, 1870). Fauna Ibérica 10, 537-556.
- Salvador, A., Busack, S.D., 2015. Lagartija andaluza - *Podarcis vaucheri* (Boulenger, 1905). Dins: A. Salvador, A. Marco (Eds.), Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Salvador, A., Carretero, M.A., 2016. Lagartija parda - *Podarcis liolepis* (Boulenger, 1905). Dins: A. Salvador, A. Marco (Eds.), Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Salvi, D., Harris, D.J., Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Pinho, C., 2013. Persistence across Pleistocene ice ages in Mediterranean and extra-Mediterranean refugia: phylogeographic insights from the common wall lizard. BMC Evol Biol 13, 147.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1626 p.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2100 p.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74, 5463-5467.
- Santos, A., 2014. Multilocus Phylogenetics: Inferring the Species-Tree of the Iberian and North African *Podarcis* Wall Lizards. Mestrado em Biodiversidade, Genética e Evolução. Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), Porto.
- San-Jose, L.M., Granado-Lorencio, F., Sinervo, B., Fitze, P.S., 2013. Iridophores and Not Carotenoids Account for Chromatic Variation of Carotenoid-Based Coloration in Common Lizards (*Lacerta vivipara*). Am Nat 181, 396-409.
- Scherer, D., Kumar, R., 2010. Genetics of pigmentation in skin cancer: a review. Mutat Res 705, 141-153.
- Schettino, A., Turco, E., 2006. Plate kinematics of the Western Mediterranean region during the Oligocene and Early Miocene. Geophys J Int 166, 1398-1423.
- Schiaffino, M.V., 2010. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. Int J Biochem Cell Biol 42, 1094-1104.
- Schioth, H.B., Haitina, T., Ling, M.K., Ringholm, A., Fredriksson, R., Cerda-Reverter, J.M., Klovins, J., 2005. Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the melanocortin receptor subtypes. Peptides 26, 1886-1900.



- Schlotterer, C., Tobler, R., Kofler, R., Nolte, V., 2014. Sequencing pools of individuals - mining genome-wide polymorphism data without big funding. *Nat Rev Genet* 15, 749-763.
- Sfenthourakis, S., Svenning, J.C., 2011. Mediterranean biogeography: where history meets ecology across scales. *Front Biogeogr* 3, 7-9.
- Simeonov, D.R., Wang, X., Wang, C., Sergeev, Y., Dolinska, M., Bower, M., Fischer, R., Winer, D., Dubrovsky, G., Balog, J.Z., 2013. DNA variations in oculocutaneous albinism: an updated mutation list and current outstanding issues in molecular diagnostics. *Hum Mutat* 34, 827-835.
- Steindachner, F., 1870. Herpetologische Notizen (II). Reptilien gesammelt Während einer Reise in Sengambien. *Sitzungsber Kaiserl Akad Wiss (Wien)* 62, 326-350.
- Steiner, C.C., Weber, J.N., Hoekstra, H.E., 2007. Adaptive Variation in Beach Mice Produced by Two Interacting Pigmentation Genes. *PLoS Biol* 5, e219.
- Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68, 978-989.
- Stephens, M., Donnelly, P., 2003. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73, 1162-1169.
- Stephens, M., Scheet, P., 2005. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 76, 449-462.
- Sturm, R.A., 2009. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet* 18, R9-17.
- Tae-Hun, K., Nam-Soon, K., Dajeong, L., Kyung-Tai, L., Jung-Hwa, O., Hye-Sook, P., Gil-Won, J., Hyung-Yong, K., Mina, J., Bong-Hwan, C., 2006. Generation and analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue. *BMC Genomics* 7, 36.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Takeuchi, S., Suzuki, S., Hirose, S., Yabuuchi, M., Sato, C., Yamamoto, H., Takahashi, S., 1996. Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1306, 122-126.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Taylor, J.D., Hadley, M.E., 1970. Chromatophores and color change in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 104, 282-294.
- Team, R.C., 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619-633.

- Templeton, A.R., Sing, C.F., 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134, 659-669.
- Terrasa, B., Picornell, A., Castro, J., Ramon, M., 2004. Genetic variation within endemic *Podarcis* lizards from the Balearic Islands inferred from partial Cytochrome b sequences. *Amphibia-Reptilia* 25, 407-414.
- Terrasa, B., 2009. Variació genètica de la sargantana balear. Filogeografia de *Podarcis lilfordi* a partir de DNA mitocondrial. Tesi Doctoral en Biologia. Universitat de les Illes Balears, Palma.
- Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Brown, R.P., Picornell, A., Castro, J.A., Ramon, M.M., 2009. Foundations for conservation of intraspecific genetic diversity revealed by analysis of phylogeographical structure in the endangered endemic lizard *Podarcis lilfordi*. *Diversity Distrib* 15, 207-221.
- Tezuka, A., Yamamoto, H., Yokoyama, J., van Oosterhout, C., Kawata, M., 2011. The *MC1R* gene in the guppy (*Poecilia reticulata*): Genotypic and phenotypic polymorphisms. *BMC Res Notes* 4, 31.
- Thomson, R.C., Wang, I.J., Johnson, J.R., 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Mol Ecol* 19, 2184-2195.
- Townsend, T.M., Alegre, R.E., Kelley, S.T., Wiens, J.J., Reeder, T.W., 2008. Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: an example from squamate reptiles. *Mol Phylogenet Evol* 47, 129-142.
- Trullas, S.C., van Wyk, J.H., Spotila, J.R., 2007. Thermal melanism in ectotherms. *J Therm Biol* 32, 235-245.
- Van't Hof, A.E., Campagne, P., Rigden, D.J., Yung, C.J., Lingley, J., Quail, M.A., Hall, N., Darby, A.C., Saccheri, I.J., 2016. The industrial melanism mutation in British peppered moths is a transposable element. *Nature* 534, 102-105.
- Vasconcelos, R., Harris, D.J., Carretero, M.A., Pinho, C., Corti, C., Capula, M., Bassu, L., Spano, G., Delauguerre, M., 2006. Genetic diversity within Corsican and Sardinian specimens of the Tyrrhenian Wall Lizard, *Podarcis tiliguerta*, estimated using mtDNA sequences. Dins: C. Corti, P. Lo Cascio, M. Biaggini (Eds.). Mainland and insular lizards. A Mediterranean perspective. Firenze University Press, Florence, 199-207.
- Vences, M., 2009. Lizard radiations. Dins: R.G. Gillespie, D.A. Clague (Eds.). *Encyclopedia of Islands*. University of California Press, California, 554-564.
- Vercken, E., Massot, M., Sinervo, B., Clobert, J., 2007. Colour variation and alternative reproductive strategies in females of the common lizard *Lacerta vivipara*. *J Evol Biol* 20, 221-232.
- Verlaque, R., Médail, F., Quézel, P., Babinot, J.F., 1997. Endémisme végétal et paléogéographie dans le bassin méditerranéen. *Geobios* 30, 159-166.



- Vilà-Valentí, J., Vallès-Costa, R., Ramon, F., Prats, E., 2000. Geografia de les Illes Pitiüses. I. Presentació, Geografia Física i Biogeografia. Dins: J. Vilà-Valentí, R. Vallès-Costa (Eds.). Territoris. Institut d'Estudis Eivissencs, Eivissa 3, 401-420.
- Vitt, L.J., Caldwell, J.P., 2013. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. Academic Press, Oklahoma. 776 p.
- Vogiatzakis, I.N., Pungetti, G., Mannion, A.M., 2008. Mediterranean island landscapes: natural and cultural approaches. Springer Science & Business Media, Nehterlands. 369 p.
- Voisey, J., Van Daal, A., 2002. *Agouti*: from Mouse to Man, from Skin to Fat. Pigment Cell Melanoma Res 15, 10-18.
- Vrieling, H., Duhl, D., Millar, S.E., Miller, K.A., Barsh, G.S., 1994. Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. Proc Natl Acad Sci USA 91, 5667-5671.
- Wagler, J., 1830. Natürliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Säugthiere und Vögel. Ein Beitrag zur vergleichenden Zoologie. J. G. Cotta'sche Buchhandlung, München. 354 p.
- Weibel, A.C., Moore, W.S., 2002. A test of a mitochondrial gene-based phylogeny of woodpeckers (genus *Picooides*) using an independent nuclear gene, β -fibrinogen intron 7. Mol Phylogenet Evol 22, 247-257.
- Wiens, J.J., Donoghue, M.J., 2004. Historical biogeography, ecology and species richness. Trends Ecol Evol 19, 639-644.
- Wiens, J.J., Hutter, C.R., Mulcahy, D.G., Noonan, B.P., Townsend, T.M., Sites, J.W., Reeder, T.W., 2012. Resolving the phylogeny of lizards and snakes (Squamata) with extensive sampling of genes and species. Biol Lett 8, 1043-1046.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L., Wang, Y., 2003. An index of substitution saturation and its application. Mol Phylogenet Evol 26, 1-7.
- Xia, X., Lemey, P., 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. Dins: P. Lemey, M. Salemi, A.M. Vandamme (Eds). The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge University Press, Cambridge 2, 615-630.
- Yamaguchi, Y., Brenner, M., Hearing, V.J., 2007. The regulation of skin pigmentation. J Biol Chem 282, 27557-27561.
- Yang, L., Jin, G., Zhao, X., Zheng, Y., Xu, Z., Wu, W., 2007. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. Bioinformatics 23, 2174-2177.
- Yang, Z., Rannala, B., 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. Proc Natl Acad Sci USA 107, 9264-9269.
- Zhang, D.X., Hewitt, G.M., 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Mol Ecol 12, 563-584.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A., 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. Bioinformatics 29, 2869-2876.

- Zhang, J., Liu, F., Cao, J., Liu, X., 2015. Skin Transcriptome Profiles Associated with Skin Color in Chickens. PLoS One 10, e0127301.
- Zhang, N., Zeng, L., Shan, H., Ma, H., 2012. Highly conserved low-copy nuclear genes as effective markers for phylogenetic analyses in angiosperms. New Phytol 195, 923-937.
- Zhang, X.H., Pang, Y.Z., Zhao, S.J., Xu, H.W., Li, Y.L., Xu, Y., Guo, Z., Wang, D.D., 2013. The relationship of plumage colours with *MC1R* (Melanocortin 1 Receptor) and *ASIP* (Agouti Signaling Protein) in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Br Poult Sci 54, 306-311.