

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Zoología y Antropología Física



TESIS DOCTORAL

Origen y mantenimiento de la diversidad fenotípica en poblaciones ibéricas de lagartija colilarga

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Joaquín Verdú Ricoy

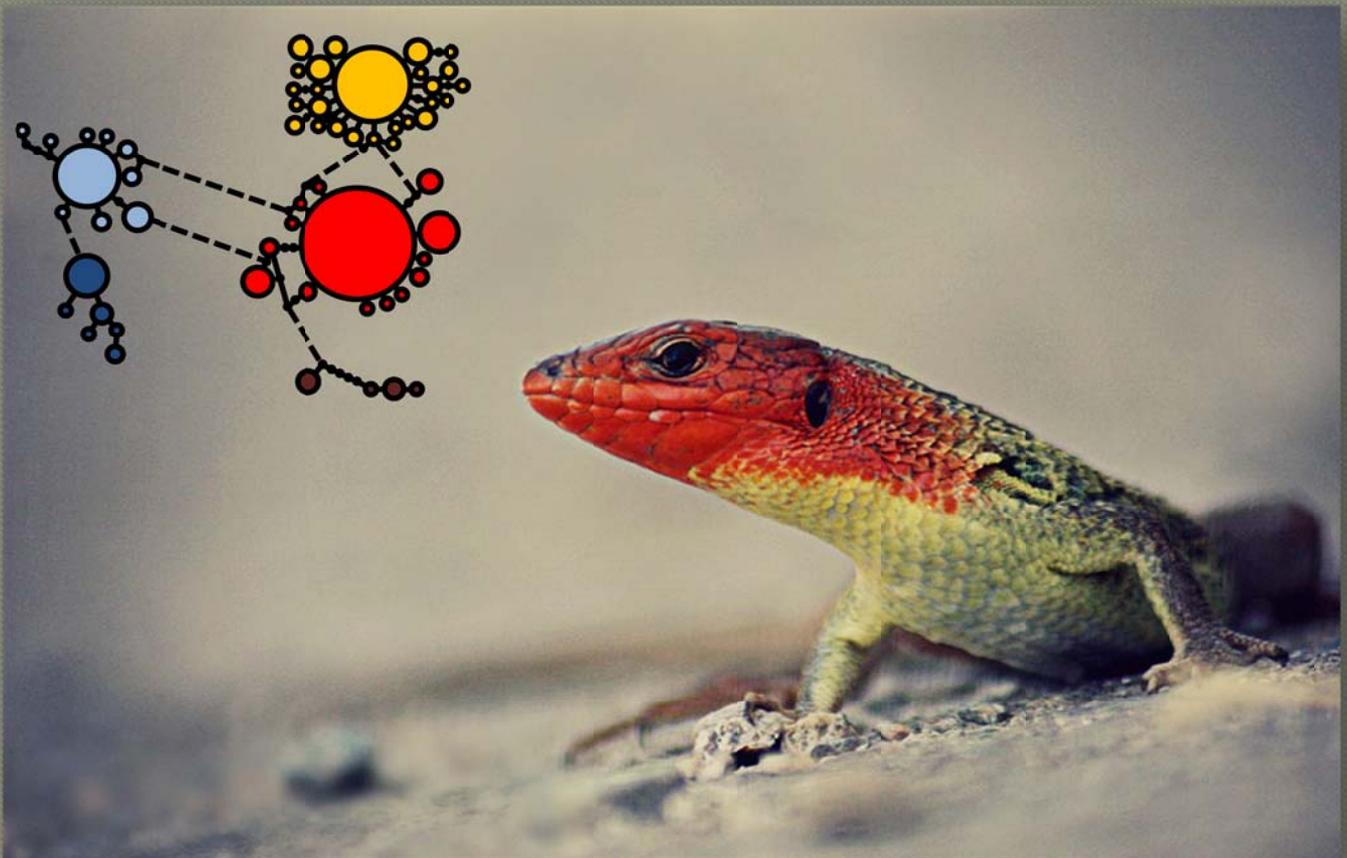
Directores

José Augusto. Díaz González-Serrano
Alfredo Salvador Milla

Madrid, 2014

Origen y mantenimiento de la diversidad fenotípica en poblaciones ibéricas de lagartija colilarga

Joaquín Verdú Ricoy
Tesis Doctoral 2013



Departamento de Ecología Evolutiva
Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC

Departamento de Zoología y Antropología Física
Facultad de Ciencias Biológicas, UCM





Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Biología
Departamento de Zoología y Antropología Física

Origen y mantenimiento de la diversidad fenotípica en poblaciones ibéricas de lagartija colilarga

Memoria presentada por el licenciado Joaquín Verdú Ricoy para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Dirigida por el Dr. José A. Díaz González-Serrano, de la Universidad Complutense de Madrid, y el Dr. Alfredo Salvador Milla, del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC).

Madrid, mayo de 2013

El doctorando

VºBº del director

VºBº del director

Joaquín Verdú

José A. Díaz

Alfredo Salvador

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1.- Aspectos generales	1
2.- Los lagartos como modelo de estudio	6
3.- Las variables de interés: estrategias vitales y patrones de coloración	8
4.- El género <i>Psammodromus</i> y el caso de <i>P. algirus</i> en la Península Ibérica	10
4.1. ¿Por qué <i>Psammodromus algirus</i> ?	12
4.2. Estudios de filogeografía y diversidad genética	15
4.3. Estudios de diversidad fenotípica	16
4.4. Contexto del presente estudio	19
5.- Objetivos específicos	20
II. Capítulo 2. Nuevos datos sobre la filogeografía de <i>Psammodromus algirus</i>: implicaciones sistemáticas	25
Introducción	26
Material y métodos	27
Resultados y discusión	30
III. Capítulo 3. Variación intraespecífica de los caracteres reproductivos: diferencias entre puestas, poblaciones y linajes	35
Introducción	37
Material y métodos	40
Resultados	45
Discusión	49
IV. Capítulo 4. Respuestas fenotípicas a las condiciones de incubación en <i>Psammodromus algirus</i>: un experimento con poblaciones ecológicamente diferenciadas de dos linajes filogeográficos	55
Introducción	57
Material y métodos	60
Resultados	65
Discusión	72

V. Capítulo 5. El uso de marcadores nucleares revela la existencia de flujo génico entre linajes mitocondriales del lacértido <i>Psammodromus algirus</i>	81
Introducción	83
Material y métodos	86
Resultados	94
Discusión	103
VI. Capítulo 6. Biogeografía de la coloración dorsal en poblaciones ibéricas de lagartija colilarga: ¿estructura filogeográfica o adaptación para facilitar la cripsis?	115
Introducción	117
Material y métodos	119
Resultados	126
Discusión	129
VII. DISCUSIÓN GENERAL	139
VIII. CONCLUSIONES	147
SUMMARY	149
1. Introduction	149
2. Phylogeography of <i>Psammodromus algirus</i> (Lacertidae) revisited: systematic implications	152
3. Intraspecific variation of reproductive traits in a Mediterranean lizard: clutch, population, and lineage effects	152
4. Phenotypic responses to incubation conditions in ecologically distinct populations of the lizard <i>Psammodromus algirus</i> : a tale of two phylogeographic lineages	153
5. Nuclear markers reveal extensive gene flow between mitochondrial DNA lineages of a widespread Iberian lizard	154
6. Geographic distribution of dorsal stripes in Iberian populations of <i>Psammodromus algirus</i> : the role of crypsis and phylogeography	155
7. Conclusions	156
8. Literature Cited	157
BIBLIOGRAFÍA	161
ANEXOS	189

I. INTRODUCCIÓN

1.- Aspectos generales

La enorme diversidad que se puede observar en la naturaleza a todos los niveles, desde el genético hasta el ecosistémico, es probablemente el rasgo más llamativo de la biosfera (Wilson 1994). Con una variación de tal magnitud y extensión, con casi dos millones de especies descritas en la actualidad, y un número desconocido pero sin duda muy elevado de especies por describir (Mora et al. 2011, Tellería 2012), la idea de detectar ciertas características o patrones que puedan compartir todas ellas supone un verdadero reto. Paradójicamente, es la propia variabilidad la que constituye tal vez el rasgo compartido más relevante, pues la variación intraespecífica –continua o discreta, sexual, ontogenética, social, ecológica, estacional o interpoblacional– es una característica común de todas las especies descritas hasta la fecha (Mayr y Ashlock 1991). En realidad, esta variación representa la base sobre la que se construye la biodiversidad existente, pues son precisamente las diferencias intraspecíficas las que se correlacionan con la eventual aparición de nuevas especies (aunque es interesante señalar que, por definición, la especiación se traducirá, por lo menos a corto plazo, en un aumento de la diversidad interespecífica y en una disminución de la diversidad intraespecífica media).

En consecuencia, y dada la importancia de la variación intraespecífica, no es de extrañar que la comprensión de los factores que causan la divergencia fenotípica entre poblaciones (aislamiento geográfico y genético, selección natural o sexual y/o plasticidad fenotípica) sea uno de los principales temas de la biología evolutiva. Desde este punto de vista, las especies con linajes alopátridas bien diferenciados constituyen modelos de estudio particularmente útiles y esclarecedores.

No es de extrañar, por tanto, que el desarrollo más importante en el estudio de la variación intraespecífica haya estado determinado por el auge que ha experimentado a lo largo de las últimas décadas la disciplina conocida como filogeografía, que consiste en la descripción y el análisis de los procesos responsables de la distribución y estructura geográfica de los linajes de genes dentro de una misma especie, o en especies estrechamente emparentadas, y proporciona información relevante sobre los movimientos, historia demográfica y proceso de formación de linajes, subespecies y

eventualmente especies (Avice 1989). Así, el estudio de las zonas de contacto (es decir, de hibridación) entre los linajes genéticamente divergentes ha producido avances significativos en la comprensión de los mecanismos que gobiernan la evolución del aislamiento reproductivo (Burton y Hewitt 1985, Harrison 1993). Aunque la mayor parte de las zonas híbridas que han sido estudiadas en profundidad afectan a linajes con diferencias fenotípicas claramente apreciables asociadas a un cierto grado de aislamiento pre- o postcigótico (Burton y Hewitt 1989, Harrison 1993), los estudios filogeográficos están desvelando un número creciente de zonas de contacto secundario entre linajes profundamente diferenciados desde el punto de vista genético pero totalmente crípticos desde el punto de vista morfológico, de forma que solo pueden distinguirse recurriendo a los marcadores moleculares (Hewitt 2001). De hecho, en la mayor parte de los casos no se sabe si existen barreras al flujo génico que puedan haber llevado a los linajes a desarrollar diferencias sutiles en determinados aspectos de su morfología, fisiología o comportamiento, a pesar de que esta información es importante para predecir la trayectoria evolutiva de las zonas de contacto: coexistencia estable, reemplazo, mezcla o diferenciación (Burton y Hewitt 1989, Harrison 1993, Hewitt 2001).

Por otra parte, la comunidad científica reconoce desde hace ya un cuarto de siglo que no se puede hacer biología comparada, por lo menos a nivel interespecífico, sin tener en cuenta la filogenia. En palabras de Felsenstein (1985), “(aunque sería deseable) presentar un método simple y robusto que eludiera la necesidad de un conocimiento detallado de la filogenia (...), no hay forma de solucionar el problema (...). Es comprensible que los investigadores interesados en hacer biología comparada se sientan frustrados al oír que necesitan conocer con detalle las filogenias de los grupos con los que trabajan, cuando esto es algo que en principio no les interesa demasiado. Sin embargo, los esfuerzos para hacer frente a los efectos de la filogenia son ineludibles. Las filogenias son coesenciales a la biología comparada, y ésta no se puede llevar a cabo sin tenerlas en cuenta”.

Es llamativo que, a pesar de que exactamente el mismo problema afecta a las poblaciones o linajes dentro de una misma especie –que, de hecho, y al igual que las especies, forman parte de una escala jerárquica de relaciones genealógicas, por lo que no pueden contemplarse como datos independientes extraídos de una misma distribución– escasean los estudios de evolución fenotípica, a nivel interpoblacional,

que tengan en cuenta las relaciones filogenéticas (o, para ser más precisos, filogeográficas) de modo explícito.

En cualquier caso, el potencial que tiene enmarcar los rasgos fenotípicos en un contexto filogenético explícito se hace evidente no sólo al nivel más general del estudio histórico de la adaptación a nivel macroevolutivo (Baum y Larson 1991, Dial y Grismer 1992), sino también a la hora de comprender los procesos de diferenciación responsables de la divergencia entre poblaciones de una misma especie; sólo sobre la base de la información filogeográfica suministrada por los marcadores moleculares es posible distinguir qué papel juegan el aislamiento, la deriva y la selección natural en la evolución de las diferencias interpopulacionales (y, eventualmente, en la especiación). De hecho, hay varios trabajos que han adoptado este tipo de planteamientos con resultados francamente prometedores (véase, no obstante, Niewiarowski et al. 2004). Así, Keogh et al. (2005) documentan la rápida evolución del tamaño corporal –con ejemplos tanto de enanismo como de gigantismo– en poblaciones insulares del elárido australiano *Notechis ater / scutatus*, con una divergencia genética inferior en todos los casos al 0.38% respecto de las poblaciones continentales más cercanas, frente a la hipótesis alternativa de que la distribución actual de las tallas adultas representa la distribución relictiva de fenotipos ancestrales diferenciados antes de la insularización; la rápida evolución del tamaño es claramente interpretable como una adaptación a la talla media de las presas disponibles.

Janzen et al. (2002) muestran que las subespecies “clásicas”, basadas en la morfología, de las serpientes de jarretera (*Thamnophis sirtalis*) del oeste de Norteamérica están totalmente entremezcladas con los linajes revelados por los análisis de ADN mitocondrial, y extraen dos conclusiones interesantes: en primer lugar, su invalidez taxonómica, ya que algunas poblaciones están más emparentadas con otras morfológicamente “de otra subespecie” que con las de su propia subespecie; y, en segundo lugar, que debe haber habido mucha convergencia en los rasgos morfológicos (patrones de coloración), lo que implica que la selección natural ha debido desempeñar un papel importante.

Oufiero y Angilletta (2006) emplean cinco poblaciones de dos linajes diferentes de *Sceloporus undulatus* para demostrar que en ambos linajes las poblaciones de ambientes fríos crecieron más y eclosionaron antes que las de ambientes cálidos,

presentando también huevos de mayor tamaño, aunque un experimento de miniaturización puso de manifiesto que la mayor eficacia en el crecimiento era independiente del tamaño del huevo; en conjunto, estos resultados sugieren evolución convergente de un patrón de variación contragradiante en los dos linajes.

Nunes et al. (2011) examinan la variabilidad morfológica y genética en tres subespecies de *Timon lepidus* (antes *Lacerta lepida*), hallando que el grado de diferenciación de la coloración dorsal entre las subespecies es consistente con el nivel de diferenciación en el ADN mitocondrial. Además, descubren una variante del gen *Mcr1* (involucrado en la síntesis de melanina) asociada al fenotipo con menor proporción de escamas dorsales negras (*L. l. nevadensis*, del sudeste peninsular) y documentan un aumento de la proporción de escamas negras en dirección SE-NO.

Malhotra y Thorpe (2000) estudian la variación genética y morfológica en *Anolis oculatus* de Dominica (Antillas Menores) y encuentran dos linajes fuertemente diferenciados que no concuerdan con la variación en rasgos funcionalmente importantes como la forma del cuerpo y la folidosis pero sí con los patrones de coloración, por lo que sugieren que tanto el aislamiento como la selección natural han afectado a la diferenciación morfológica en esta especie. Recientemente, Glor y Laport (2012) han comprobado que las cinco subespecies de *Anolis distichus* y las tres de *A. brevirostris* de República Dominicana, además de presentar despliegues gulares que difieren en colorido y patrón (lo que es importante para el reconocimiento interespecífico), presentan haplotipos mitocondriales con elevados niveles de divergencia ($\geq 10\%$) y una distribución que concuerda fuertemente con la variación fenotípica observada, lo que justifica su elevación al rango de especies distintas.

Sin embargo, el conjunto de trabajos que mejor documentan el potencial de las aproximaciones moleculares al estudio de la variación fenotípica entre poblaciones de una misma especie es el desarrollado por el equipo de Erica Rosenblum (Rosenblum et al. 2004 y 2010, Rosenblum 2005, 2006 y 2008, Rosenblum y Harmon 2011, Robertson y Rosenblum 2009 y 2010) en el sistema conocido como White Sands, un campo de dunas de yeso móviles que ocupa una extensión de 712 km² en la cuenca de Tularosa (Nuevo México, EEUU), y cuya antigüedad no supera los 6.000 años. El color del sustrato en la zona de arenas blancas contrasta dramáticamente con el color oscuro del desierto circundante. Tres especies de lagartos, los frinosomátidos *Holbrookia maculata*

y *Sceloporus undulatus* y el teido *Aspidoscelis inornata* (antes *Cnemidophorus inornatus*) representan líneas evolutivas independientes que han desarrollado formas pálidas en las dunas cuya coloración contrasta de forma igualmente dramática con los tonos oscuros que se dan en el resto de su área de distribución (Norris y Lowe 1964); se trata, por tanto, de adaptaciones convergentes a un ambiente común, cuya base genética tiene origen –al menos para *S. undulatus* y *A. inornata*– en distintas mutaciones en la secuencia de *Mclr*, un gen nuclear que codifica una proteína receptora involucrada en la producción de melanina en los vertebrados (Barsh 1996, Rosenblum et al. 2004). Estas mutaciones tienen efectos moleculares que, de forma independiente en ambos casos, conllevan la reducción de la funcionalidad del receptor (en *S. undulatus* no se integra bien en la membrana, mientras que en *A. inornata* la transmisión de la señal es defectuosa), por lo que resultan en fenotipos convergentes de coloración pálida en ambas especies (Rosenblum et al. 2010).

Los niveles de aislamiento entre las formas pálidas y oscuras estimados con ADN mitocondrial sugieren que la respuesta a la selección en cada una de las especies es inversamente proporcional al nivel de flujo génico en cada una de ellas (Rosenblum 2006); *H. maculata*, la especie con más estructura genética y con una distribución más parcheada, es la que más diferencia presenta entre las formas clara y oscura, mientras que *A. inornata*, casi panmíctica a escala regional, es la que presenta un nivel de diferenciación relativamente menor, ocupando *S. undulatus* una posición intermedia. Por tanto, y aunque la convergencia de las formas pálidas refleja fuertes presiones de selección a favor de la divergencia intraespecífica, la capacidad de adaptación parece modulada por los niveles de flujo, condicionados por las características ecológicas y demográficas de cada especie (Rosenblum 2006). Además, las tres especies suministran ejemplos replicados de especiación parapátrida en curso, con el interés añadido de que se encuentran en distintas etapas de este proceso; en conjunto, la estructura genética sugiere que *H. maculata* está próxima a completar la especiación, *S. undulatus* se encuentra en proceso de especiación pero lejos de completarlo, y *A. inornata* se muestra de momento incapaz de especiar (Rosenblum y Harmon 2011).

En referencia a la especiación, es importante señalar que las mutaciones del *Mclr* y los cambios que tienen lugar en las formas pálidas afectan también a otros patrones de coloración, incluyendo las manchas amarillas, naranjas, azules y verdes que estos lagartos emplean como señales en las interacciones sociales (sistemas de

apareamiento y territorialidad; Robertson y Rosenblum 2009 y 2010). Los machos pálidos resultan más agresivos hacia los machos de su misma condición (Robertson y Rosenblum 2010) y cortejan más a las hembras pálidas que a las oscuras (Rosenblum 2008). Además, un efecto colateral inesperado de los cambios de coloración es que, en el caso de *S. undulatus*, los machos pálidos tienden a cortejar a los machos oscuros debido a que el patrón de manchas azules en los lados del vientre de estos últimos es muy semejante al de las hembras pálidas (Robertson y Rosenblum 2010). En cualquier caso, el posible vínculo entre selección natural y sexual en los lagartos de White Sands evidencia que una única mutación puede tener efectos importantes tanto para la adaptación como para las primeras fases de la especiación.

2.- Los lagartos como modelo de estudio

Como ponen de manifiesto los ejemplos citados en el apartado anterior, los lagartos (y, en general, los reptiles) constituyen modelos recurrentemente utilizados en este tipo de estudios. Puesto que la variación fenotípica depende conjuntamente de las diferencias en los genotipos y de la variación ambiental, parece razonable concluir que las especies con elevados niveles de diferenciación, resultado de episodios de aislamiento geográfico relacionados con una fuerte dependencia de las condiciones ambientales y/o con una escasa capacidad de dispersión, se presenten *a priori* como idóneas para estudiar el origen y mantenimiento de la diversidad fenotípica. En este sentido, los reptiles (Clase Reptilia) constituyen un grupo que encaja a la perfección dentro de este marco. La diversidad actual de este grupo de vertebrados, con 9.766 especies identificadas (según la última actualización de *The Reptile Database*, Uetz y Etzold 1996), los sitúa junto con las aves como el grupo más numeroso de vertebrados terrestres. En particular, el orden Squamata (que engloba a los saurios, ofidios y anfisbénidos) es con diferencia el principal responsable de esta diversidad representando a más del 96% de todos los reptiles actuales; el género *Anolis*, por poner sólo un ejemplo, es el más rico en especies de todos los amniotas (Losos 2009), e incluye la primera especie de reptil, *A. carolinensis*, cuyo genoma completo ha sido secuenciado (Alföldi et al. 2011).

Una de las características que indudablemente más ha condicionado la evolución y diversidad de los escamosos ha sido su condición de ectotermos, que les ha conferido ventajas indiscutibles relacionadas sobre todo con los bajos requerimientos energéticos

(Pough 1980), pero al mismo les ha impuesto una fuerte dependencia respecto de las condiciones térmicas ambientales. Precisamente esta dependencia térmica tan acusada es la que ha forzado a muchas especies de lagartos y lagartijas a buscar refugio en zonas alternativas de clima favorable durante los períodos en los que las condiciones climatológicas han sido adversas, como por ejemplo durante los episodios glaciares del Cuaternario (Hewitt 1996, 1999). A lo largo de estos periodos, el avance de los casquetes glaciares desde el norte de la región Paleártica obligó a las poblaciones de lagartos y serpientes de Europa occidental a refugiarse en las penínsulas meridionales del continente para poder sobrevivir, o en su defecto, en zonas bajas y más térmicas como los fondos de valle, lo que supuso la fragmentación de muchas de ellas. El aislamiento geográfico y la escasa capacidad de dispersión propia de estos reptiles provocaron la aparición de diferencias genéticas entre las poblaciones geográficamente separadas. Además, las dinámicas de contracción y expansión de las poblaciones durante los respectivos periodos glaciares e interglaciares contribuyeron a dejar una herencia de profundas señales filogeográficas en la estructura genética de muchas especies, reforzando los procesos incipientes de divergencia, y en los casos más extremos, culminándolos con la especiación. Así, no es de extrañar que las especies de reptiles escamosos, en particular los lagartos, constituyan excelentes modelos para combinar los estudios de filogeografía y especiación (Camargo et al. 2010).

En particular, la Península Ibérica ha protagonizado un papel mucho más complejo que el de mero refugio glacial, o conjunto de refugios glaciares, para numerosas especies de lagartos y lagartijas, promoviendo elevados niveles de diferenciación intraespecífica que se reflejan en la estructura filogeográfica de varios taxones actuales de distribución parcial o exclusivamente ibérica (Harris et al. 2002, Carranza et al. 2006, Pinho et al. 2006, 2007a y 2008, Godinho et al. 2008, Renoult et al. 2009, Fitze et al. 2011, Miraldo et al. 2011). En particular, ciertas características de la Península han promovido la diversidad de hábitats disponibles durante las épocas glaciares, favoreciendo el aislamiento de las poblaciones durante las sucesivas contracciones y expansiones geográficas a lo largo del Cuaternario. Entre tales características cabe destacar la presencia de varias cadenas montañosas con una orientación este-oeste que amplía la variedad de microclimas disponibles, permitiendo la supervivencia de las poblaciones mediante desplazamientos altitudinales que rastrearían las condiciones favorables a medida que el clima se hace más frío o más

cálido (Hewitt 1996). Esta alternancia de valles y sierras, junto con su ubicación geográfica entre África y Europa y la consecuente variedad climática, con claras influencias mediterránea y atlántica y climas que van de subdesérticos a alpinos, hacen del extremo sudoccidental de Europa un enclave idóneo para la proliferación de refugios glaciares, aislados unos de otros, que habrían dado lugar a procesos de diferenciación alopátrida en numerosas especies de lagartos, convirtiendo a la Península Ibérica en un auténtico reservorio de diversidad y endemismo (Arnold y Burton 2007).

Sin embargo, y como ya se ha mencionado antes, las diferencias (filo)genéticas no suponen la única fuente de variación para la diversidad fenotípica observable en los saurios, como demuestran las comparaciones entre poblaciones de una misma especie, genéticamente muy parecidas entre sí pero fenotípicamente muy diferenciadas como consecuencia de la adaptación a ambientes distintos a lo largo de, por ejemplo, un gradiente altitudinal (Iraeta et al. 2006 y 2013, en comparación con los resultados del Capítulo 5 de esta memoria). En general, cabe esperar que la importancia relativa de los efectos (filo)genéticos sea mayor en el caso de las aproximaciones interespecíficas, mientras que los efectos ambientales deberían imponerse a nivel de las comparaciones entre poblaciones de una misma especie. Por tanto, uno de los marcos más interesantes para estudiar los efectos combinados de ambos tipos de factores, y su papel a la hora de explicar el origen y mantenimiento de la diversidad fenotípica, es precisamente el situado en el límite entre lo interespecífico (patrones de macroevolución relacionados con la divergencia entre especies) y lo intraspecífico (procesos microevolutivos entre poblaciones de una misma especie; Corl et al. 2010). En la práctica, esto se puede llevar a cabo utilizando como modelo para las comparaciones interpoblacionales especies que combinen una distribución amplia, que cubra una gama lo suficientemente variada de condiciones ambientales distintas, con una estructura filogeográfica bien definida, incluyendo linajes diferenciados durante un tiempo suficientemente largo. En este sentido, la presencia de poblaciones sometidas a diferentes condiciones ambientales y con niveles apreciables de divergencia entre las mismas es, como ya se ha mencionado, un fenómeno bastante frecuente en las especies ibéricas de lagartos y lagartijas.

3.- Las variables de interés: estrategias vitales y patrones de coloración

Los rasgos fenotípicos susceptibles de estudio abarcan un número casi ilimitado de caracteres morfológicos, fisiológicos y comportamentales, por lo que es necesario

seleccionar sólo algunos de ellos. Para esta memoria, se ha optado por centrar nuestra atención en dos tipos de rasgos: los relacionados con las estrategias vitales *sensu lato* (Capítulos 3 y 4), y el patrón de coloración dorsal (Capítulo 6), muy variable en esta especie y posiblemente relacionado con la crípsis y la estrategia antidepredatoria. Se trata, por tanto, de caracteres fenotípicos muy vinculados a los dos componentes básicos de la eficacia biológica: éxito reproductor en el primer caso, y supervivencia en el segundo.

Estrategias vitales.- Las estrategias vitales pueden ser definidas como conjuntos de rasgos coadaptados que determinan cuanta energía destina un organismo a la reproducción, frente a las demandas competidoras de mantenimiento y crecimiento, y cómo esa inversión reproductiva se divide entre propágulos individuales (Stearns 1992, Roff 1992). Estas combinaciones de rasgos se suponen ajustadas al ambiente por selección natural. Por ejemplo, los modelos teóricos predicen que, incluso una vez que los recursos destinados a la reproducción se han fijado, la selección natural puede todavía dar forma al reparto de esa inversión en pocos propágulos grandes o muchos propágulos pequeños (Lack 1954, Sinervo y Licht 1991, Stearns 1992). Pues bien, los reptiles escamosos representan modelos excelentes para el estudio de la evolución de las estrategias vitales, ya que las dos principales consecuencias de la ectotermia terrestre, los bajos requerimientos energéticos y la termorregulación comportamental, han tenido consecuencias evolutivas importantes (Shine 2005). Por ejemplo, las hembras grávidas pueden manipular las temperaturas de incubación, bien reteniendo los huevos en el oviducto (una opción que acorta los tiempos de incubación y puede desembocar en la evolución del viviparismo), bien seleccionando los sitios de puesta (Shine y Harlow 1996, Iraeta et al. 2007). Además, los reptiles, que a diferencia de aves y mamíferos no ven su tamaño corporal constreñido por las restricciones que la conservación del calor impone a los endotermos, son capaces de producir propágulos pequeños en grandes cantidades (Shine 2005). Esto promueve un ajuste dinámico de las estrategias vitales a los ambientes locales, que puede ser el resultado de la plasticidad fenotípica (causada por la variación geográfica en factores tales como las temperaturas disponibles o la abundancia de alimento) o de la adaptación a regímenes selectivos geográficamente variables (Sinervo y Adolph 1989, Adolph y Porter 1993, Iraeta et al. 2006). Esta flexibilidad ha generado una enorme cantidad de variación intraespecífica, lo que ha dado lugar a un aumento del número de estudios enfocados en el nivel de la población;

en esta línea se sitúan, con el complemento de la información filogeográfica subyacente, los resultados de los Capítulos 3 y 4.

Patrones de coloración y cripsis.- Los patrones de coloración de los animales ejercen una fuerte influencia sobre numerosos aspectos de su comportamiento social, antidepredatorio y termorregulador (Cooper y Greenberg 1992). Debido a que la coloración óptima puede ser distinta para cada una de estas funciones, y puede variar en el espacio y en el tiempo, la coloración dominante en cada población debe ser contemplada como un compromiso adaptativo moldeado por la selección. En particular, y aunque en el Capítulo 4 se aborda otro aspecto del fenotipo también relacionado con la estrategia antidepredatoria (la velocidad de carrera y estrategia de escape de los juveniles), nos hemos centrado en la función críptica de la coloración dorsal. Así, llama la atención la variabilidad de la coloración dorsal en muchas especies de lagartos de distintos continentes y varias familias. En particular, cabe destacar la aparición de diseños rayados muy similares en especies filogenéticamente distantes (Figura 1.1), lo que sugiere convergencia adaptativa causada por presiones selectivas semejantes; entre tales presiones, la más ubicua es el riesgo de depredación por depredadores diurnos orientados visualmente, dada la importancia de los lagartos como presas potenciales para numerosas especies sobre todo de aves (Martín y López 1990).



Figura 1.1. Diseños rayados evolucionados de forma independiente en distintas familias de lagartos: de izquierda a derecha, el escíncido *Plestiodon* (antes *Eumeces*) *fasciatus*; el teido *Aspidoscelis* (antes *Cnemidophorus*) *sexlineata*; y el lacértido *Acanthodactylus erythrurus*.

4.- El género *Psammodromus* y el caso de *P. algirus* en la Península Ibérica

Probablemente por ser una de las regiones con más diversidad de reptiles de toda Europa (véase más arriba), la Península Ibérica ha sido tradicionalmente una de las áreas donde se ha estudiado más intensamente la variación genética y fenotípica de los Squamata, particularmente en las numerosas especies de lagartos y lagartijas que

alberga. En este sentido, su ubicación geográfica entre África y el resto del continente europeo es una de las causas que han contribuido a que la Península Ibérica sea catalogada como un *hotspot* de biodiversidad. Por un lado, ha facilitado la entrada de numerosos taxones de origen africano y/o mediterráneo en el continente europeo, como por ejemplo, la lagartija colirroja *Acanthodactylus erythrurus* (Harris et al. 2004) y la salamanchesa común *Tarentola mauritanica* (Rato et al. 2010), y por otro, ha servido para que muchas especies continentales de la herpetofauna europea encontraran refugio durante las glaciaciones del Pleistoceno, un papel compartido con las otras penínsulas meridionales (Balcánica y, en menor medida, Itálica). Además, su compleja orografía ha promovido numerosos fenómenos de aislamiento y diferenciación genética (en muchos casos anteriores a los derivados de los procesos glaciares) en diversas especies de lagartos y serpientes, independientemente de su origen europeo o africano. Prueba de ello es la diversidad de especies descrita para géneros como *Iberolacerta* (Crochet et al. 2004) o *Podarcis* (Kaliontzopoulou et al. 2011, Harris et al. 2002, Pinho et al. 2008, Renoult et al. 2009), que en muchos casos ha supuesto la aparición de endemismos estrictamente ibéricos, o la marcada estructura genética que se ha documentado en otros taxones como el lagarto ocelado *Timon lepidus* (Paulo et al. 2008, Miraldo et al. 2011, Nunes et al. 2011), el lagarto verdinegro *Lacerta schreiberi* (Paulo et al. 2001, Godinho et al. 2006a, 2006b, 2008, Stuart-Fox et al. 2009), o las dos especies europeas del género *Psammodromus*, la lagartija cenicienta *Psammodromus hispanicus* (Fitze et al. 2011) y la lagartija colilarga *P. algirus* (Carranza et al. 2006).

En particular, la diversidad intraespecífica presente en este último género, tanto fenotípica como genética, solo se ha comenzado a revelar en los últimos años. El género *Psammodromus* forma junto con *Gallotia*, endémico del archipiélago canario, la subfamilia Gallotiinae, un taxón monofilético que constituye el grupo hermano de los restantes Lacertidae (Fu 2000, Mayer y Pavlicev 2007, Arnold et al. 2007), y que consta por tanto de los lacértidos menos emparentadas con el resto de lagartos y lagartijas de la Península Ibérica y del continente europeo (y, en realidad, de todo el Viejo Mundo). El origen geográfico de *Psammodromus* es incierto, pero su estrecho parentesco con los *Gallotia* de las Islas Canarias y la distribución de las actuales especies del género a ambos lados del Estrecho de Gibraltar (en el Magreb y la Península Ibérica) implican un origen ibérico o norteafricano. Tradicionalmente se ha considerado que el género *Psammodromus* consta de cuatro especies bien delimitadas (Figura 1.2): *P. algirus*

(presente en la Península Ibérica, sur de Francia y Norte de África), *P. hispanicus* (en la Península Ibérica y sur de Francia), y las especies africanas *P. blanci* (en Marruecos, Argelia y Túnez) y *P. microdactylus* (endémica de Marruecos). No obstante, un reciente estudio con datos filogenéticos, fenotípicos, geográficos y ambientales ha evidenciado la existencia de tres linajes filogeográficos dentro de *P. hispanicus* (Fitze et al. 2011), lo que ha derivado en un posterior trabajo taxonómico que propone elevar los tres clados a la categoría de especie (escindiendo así la especie original en *P. occidentalis*, *P. hispanicus* y *P. edwardsianus*, Fitze et al. 2012). También en el caso de *P. algirus* se han descrito dos nuevas especies ibéricas, *P. jeanneae* y *P. manuelae* (Busack et al. 2006), aunque dichas especies han sido puestas en tela de juicio (Carretero et al. 2011). Por lo tanto, la sistemática del grupo está siendo objeto de revisión en la actualidad, y la previsión es que lo seguirá siendo en un futuro próximo, sobre todo si se tiene en cuenta el auge de los trabajos multidisciplinares que combinan datos genéticos y fenotípicos con objeto de esclarecer los procesos responsables del origen, mantenimiento y evolución de la diversidad en la frontera no siempre clara entre los niveles intra- e interespecífico.



Figura 1.2. Las cuatro especies tradicionales del género *Psammodromus*: de izquierda a derecha, *P. algirus*, *P. hispanicus*, *P. blanci* y *P. microdactylus*.

4.1. ¿Por qué *Psammodromus algirus*?

Para este trabajo se ha escogido como modelo de estudio la lagartija colilarga *Psammodromus algirus*, el lacértido más común y ampliamente extendido en la región mediterránea de la Península. Se trata de una lagartija asociada a los bosques abiertos y orlas arbustivas forestales (Díaz y Carrascal 1991) que, aunque no alcanza la talla de los lagartos, es una de las lagartijas más grandes de la Península Ibérica, pudiendo llegar a alcanzar longitudes cabeza-cloaca (LCC) de hasta 93 mm en los ejemplares de mayor tamaño. Al igual que otras especies de lacértidos, *P. algirus* presenta un marcado dimorfismo sexual (Mellado y Martínez 1974, Díaz 1993), manifestado sobre todo por

el tamaño y la coloración nupcial de la cabeza, que siempre es más grande y colorida en los machos que en las hembras. Existen diversas razones por las que la lagartija colilarga se perfila como un modelo idóneo para el estudio de la variabilidad:

- Área de distribución extensa: *P. algirus* está presente en toda la región norte del Magreb (Marruecos, norte de Argelia y noroeste de Túnez), en casi toda la Península Ibérica (de la que solo falta en la franja más septentrional eurosiberiana) y en la costa sureste de Francia hasta el Ródano (Figura 1.3), y posee poblaciones insulares tanto en la Península Ibérica como en el Norte de África. A nivel ibérico, solamente el lagarto ocelado (*Timon lepidus*) y las lagartijas ibéricas (*Podarcis* spp.) poseen una distribución de igual o mayor extensión que *P. algirus*, pero en el primer caso las abundancias son mucho menores, incluso considerando la baja detectabilidad de los lagartos (Díaz et al. 2006) y en el segundo, además de tratarse de varios linajes que pueden representar especies distintas todavía por delimitar (Harris et al. 2002, Pinho et al. 2006, 2007b, 2008, Renoult et al. 2009), las preferencias de hábitat causan un patrón de distribución mucho más parcheado.

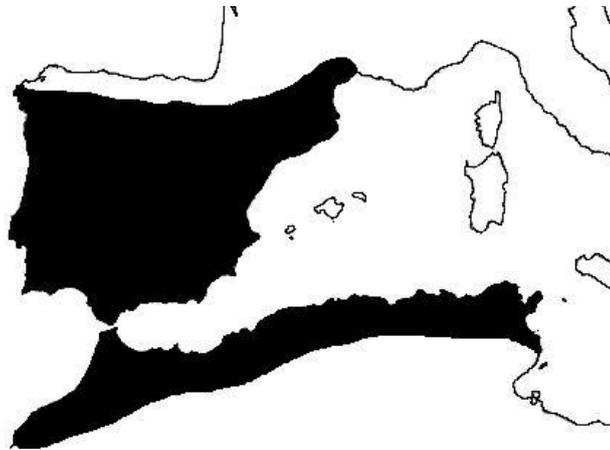


Figura 1.3. Distribución mundial de *Psammodromus algirus*. No se incluyen las recientes introducciones antrópicas en la isla de Mallorca.

- Elevadas densidades de población que facilitan la captura de individuos y la obtención de muestras suficientes para el estudio de la diversidad poblacional. En determinadas localizaciones del Sistema Central pueden superar los 100 ejemplares adultos por hectárea (Gil Costa 1992, Salvador y Veiga 2001).

- Amplio rango altitudinal inversamente relacionado con el rango latitudinal, pues llega hasta los 2.500 m en el Atlas marroquí, 1.500 m en los Pirineos y el Sistema Central y 800 m en Francia (Carretero et al. 1997, Monasterio et al. 2011). En la Península Ibérica, el rango altitudinal de *P. algirus* abarca desde zonas situadas al nivel del mar hasta los 2.400 m en Sierra Nevada. Dado que los gradientes bioclimáticos asociados con la altitud ejercen un efecto pronunciado sobre la biología de los saurios (véanse por ejemplo, para el caso de las tasas de crecimiento posnatales –uno de los rasgos que más influyen sobre las estrategias vitales de los saurios– Sinervo 1990, Grant y Dunham 1990, Sorci *et al.* 1996, Rohr 1997, Sears 2005; o, para *P. algirus*, Díaz 1997, Iraeta et al. 2006, 2008 y 2013), esta amplia distribución altitudinal, combinada con la información filogeográfica, suministra las presiones selectivas ambientales para establecer hipótesis sobre evolución convergente o paralela, inercia (filo)genética y/o diferenciación ancestral.
- Diversidad de hábitats: siempre que haya suficiente cobertura arbustiva (Díaz y Carrascal 1991), la lagartija colilarga puede habitar en encinares y pinares con sotobosque, en jarales, robledales, pinares, coscojares, espartales, arenales, vegetación de ribera e incluso hábitats muy modificados por el hombre como márgenes de caminos o cultivos. Se trata, por tanto, de una especie bastante generalista en comparación con otros lacértidos de la Península Ibérica.

Conjuntamente, el amplio rango de distribución y las notables densidades poblacionales de *P. algirus* resultan elementos que desde un punto de vista práctico convierten a la lagartija colilarga en una especie muy útil para cualquier tipo de estudio, ya que se puede encontrar en casi cualquier localidad y puede llegar a ser muy abundante, lo que facilita obtener los tamaños de muestra requeridos. Así, no es de extrañar que la lagartija colilarga se pueda considerar la especie de lacértido más fácilmente observable en las áreas forestales del territorio peninsular. Por otro lado, la diversidad de hábitats que ocupa esta especie ha debido influir en la aparición de diferencias fenotípicas entre sus poblaciones, más aún si tenemos en cuenta el papel ya mencionado de la Península Ibérica como promotor de la divergencia genética y de la diversidad fenotípica. De hecho, varios trabajos, algunos de los cuales se exponen en los siguientes apartados, han empleado a la lagartija colilarga como modelo de estudio, ya

sea para describir la estructura genética de sus poblaciones o para documentar diferencias poblacionales en rasgos morfológicos y/o reproductivos.

4.2. Estudios de filogeografía y diversidad genética

En una primera aproximación para determinar el origen y estructura filogeográfica de *P. algirus*, Busack y Lawson (2006) realizaron un estudio con muestras de España y Marruecos en el que emplearon como marcadores moleculares las secuencias parciales de los genes mitocondriales citocromo *b*, ND2 y ND4, y diversas alozimas. Tras observar mayores niveles de diferenciación en las muestras marroquíes que en las españolas, los autores concluyeron que *P. algirus* debió surgir en el continente africano y colonizar la Península Ibérica hace 2.98-3.23 Ma, mientras que las poblaciones ibéricas del norte y del sur debieron separarse hace 1.40-1.54 Ma. Este primer estudio derivó en otro trabajo de carácter taxonómico (Busack et al. 2006) que combinaba la información genética del anterior con análisis morfológicos, concluyendo que la diferenciación de las poblaciones de *P. algirus* del norte y del sur de la Península Ibérica hacía recomendable elevarlas a la categoría de especies. De este modo describieron *P. manuelae* de Manzanares el Real (Madrid) y *P. jeanneae* de 25.6 km al NE de Facinas (Cádiz). Además, los autores compararon los rasgos morfológicos empleados para describir estas dos nuevas especies con los de otras poblaciones de lagartija colilarga procedentes de zonas más orientales.

De forma independiente a estos trabajos, Carranza et al. (2006) realizaron otro estudio filogeográfico de *P. algirus* con muestras tanto de su área de distribución ibérica (España y Portugal) como norteafricana (Marruecos, Argelia y Túnez). El análisis de las secuencias parciales de los genes mitocondriales citocromo *b*, ARNr 12S y ARNr 16S demostró que *P. algirus* consta de dos linajes filogeográficos diferenciados en la Península Ibérica hace aproximadamente 3.6 Ma: un primer grupo con una distribución estrictamente ibérica (confinado a la mitad oriental de la Península) y otro que aparece tanto en la Península Ibérica (en la mitad occidental) como en todo el norte de África. De este modo, los autores concluían que *P. algirus* tuvo un origen ibérico, y que tras su escisión en los dos linajes occidental y oriental, parte del primitivo linaje occidental se extendió posteriormente al continente africano (hace aproximadamente 1.9 Ma, es decir, después de la reapertura del Estrecho de Gibraltar tras la crisis salina del Mesiniense), probablemente a través de una colonización transmarina.

Por otra parte, Pina Martins (2007) analizó muestras ibéricas y de Marruecos con secuencias de los genes mitocondriales citocromo *b*, ARNr 12S, ARNr 16S y ND4. En general, las metodologías empleadas arrojaron una información similar a la reportada por Carranza et al. (2006), apoyando la teoría de un origen ibérico de *P. algirus*. Sin embargo, en base a los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica, este autor propuso la existencia de dos eventos migratorios a través del Estrecho de Gibraltar: una primera colonización del continente africano desde la Península Ibérica por parte del clado oriental, que habría dado lugar a las poblaciones marroquíes, y una posterior reentrada en la Península Ibérica de las poblaciones marroquíes, que habría dado origen a los clados ibéricos occidentales.

Por último, y con un enfoque puramente metodológico, Bloor y Dávila (2008) describieron 8 loci de microsatélites para *P. algirus* tomando como muestra una población de Navacerrada (Madrid). Su objetivo inicial, avalado por unos niveles aceptables de polimorfismo, fue desarrollar marcadores que pudieran ser empleados en futuros estudios sobre las estrategias de apareamiento y los determinantes del éxito reproductivo individual en poblaciones de lagartija colilarga.

4.3. Estudios de diversidad fenotípica

Como ya se ha mencionado antes, la lagartija colilarga ha servido como especie modelo en múltiples estudios sobre temas ecológicos y comportamentales, incluyendo la termorregulación comportamental (Carrascal y Díaz 1989, Díaz 1991, 1992, Díaz y Cabezas-Díaz 2004), la ecología trófica (Díaz y Carrascal 1990, Díaz y Carrascal 1993, Díaz 1994), los factores reguladores de su distribución y abundancia (Díaz y Carrascal 1991), la capacidad locomotora y estrategia de escape (Martín y López 1995, 2001, Pérez-Tris et al. 2004), las consecuencias de la autotomía caudal (Salvador et al. 1995, Martín y Avery 1998) o de la fragmentación del hábitat (Díaz et al. 2000, 2005, Santos et al. 2008, 2009, Tellería et al. 2011) y los efectos de las señales químicas (López et al. 2003, Martín et al. 2007) y de la coloración nupcial (Díaz 1993, Salvador et al. 1996, 1997, Martín y Forsman 1999, Martín y López 1999, López et al. 2003), incluyendo un experimento clásico (Salvador et al. 1996) en apoyo de la hipótesis de Hamilton y Zuk (1982). No obstante, los resultados de estos trabajos se obtuvieron en base a individuos procedentes de una sola localidad, sin ningún ejemplo de comparación poblacional, lo que sin duda alguna ha limitado el estudio de la diversidad fenotípica de *P. algirus* y

también la generalización de los resultados obtenidos a todo el conjunto de sus poblaciones.

A pesar de ello, sí existen algunos trabajos que han conseguido documentar diferencias poblacionales en diversos aspectos del fenotipo de la lagartija colilarga, la mayoría de los cuales se han servido de la comparación entre localidades relativamente próximas entre sí pero sometidas a condiciones ambientales distintas por efecto de las diferencias en latitud y sobre todo altitud (véase más arriba). Por ejemplo, al comparar dos poblaciones de la provincia de Madrid situadas a diferente altitud (El Pardo, a 650-700 m, y Morcuera, a 1.400-1.500 m) y por tanto con distinta calidad térmica, Díaz (1997) halló diferencias en las temperaturas corporales, la precisión y efectividad de la termorregulación, y la capacidad locomotora predicha a partir de curvas de dependencia térmica de la fisiología. Sin embargo, un estudio posterior en laboratorio con las mismas poblaciones (Díaz et al. 2006) no detectó diferencias en el rango térmico preferido por las lagartijas de ambas localidades, a pesar de existir plasticidad fenotípica, documentada por el hecho de que en ambas localidades se detectaron diferencias significativas de carácter estacional (entre los meses de mayo y julio), con los rangos preferidos pivotando estacionalmente en torno al valor fisiológicamente óptimo para la velocidad de carrera (Bauwens et al. 1995).

Examinando un gradiente ambiental similar con las poblaciones de El Pardo y Navacerrada (otra localidad de montaña, a unos 1.200 m de altitud, menos térmica pero más productiva que la localidad de llanura), un experimento de trasplante recíproco permitió a Iraeta et al. (2006) discriminar las fuentes de variación responsables de las diferencias en diversos rasgos reproductivos y de estrategias vitales, como el tiempo de incubación, el tamaño de los juveniles al eclosionar y la tasa de crecimiento. El resultado más reseñable de este estudio fue precisamente el relativo a la velocidad a la que crecían los juveniles *P. algirus*, influenciada tanto por el entorno de crecimiento (reflejando un primer componente de variación ambiental) como, en menor medida, por la población de origen (indicando un segundo componente genético). Una prolongación de este trabajo (Iraeta et al. 2008) detectó las mismas fuentes de variación para las diferencias en las tasas de actividad antes de la hibernación, las tasas de supervivencia y las características de las puestas de ambas poblaciones. Estos dos trabajos fueron los primeros en documentar la existencia de variación contragradiente, que se produce cuando la distribución de los genotipos a lo largo de un gradiente ambiental hace que

los efectos genéticos sobre el fenotipo se opongan a los ambientales, dando lugar a una disminución de la varianza fenotípica a lo largo del gradiente o incluso a que la covariación entre ambiente y fenotipo sea de signo opuesto al de la variación genética (Levins 1968, 1969). El mismo resultado, completado con una aproximación experimental de entorno común y extendido al conjunto de las estrategias reproductivas de estas dos poblaciones, permitió a Iraeta et al. (2013) concluir que, en efecto, los genotipos que codifican para crecimiento rápido y tamaño grande de los juveniles se dan en la localidad de llanura (Iraeta et al. 2006), cuya baja productividad origina un crecimiento lento y un tamaño corporal menor, al menos en el caso de las hembras. Así, las hembras de montaña, aprovechando la mayor disponibilidad de recursos asociada a unos niveles de precipitación más elevados, alcanzan tallas mayores que les permiten poner más huevos (Fitch 1970, Pincheira-Donoso y Tregenza 2011) y, gracias a su mayor fecundidad, conseguir una mayor abundancia (Díaz 1997). Es más, si se asume que la estrategia de montaña representa el estado ancestral, lo que tiene sentido suponiendo que las poblaciones de lagartijas del centro de España quedaran confinadas a los fondos de valle durante la última glaciación, con condiciones métricas similares a las de las sierras actuales, entonces cabe argüir que las características de la población de llanura –huevos y juveniles grandes y tasas de crecimiento elevadas– sean adaptaciones recientes para una mejor supervivencia de los propágulos bajo la dura sequía estival de los ambientes mediterráneos de llanura.

Con otro objetivo distinto, el de comprobar el potencial de variación de las estrategias vitales de *P. algirus* en el límite septentrional de su área de distribución ibérica, Díaz et al. (2007) compararon los principales rasgos reproductivos de dos poblaciones situadas en el núcleo (El Pardo, Madrid) y en la periferia (Lerma, Burgos) de su área de distribución, encontrando diferencias en todas las variables estudiadas (frecuencia de segundas puestas, peso medio del huevo, tamaño de la puesta y tiempo de incubación); estas diferencias fueron interpretadas en función de las adaptaciones de cada población a las condiciones ambientales locales.

Por último, Carretero (2002) realizó un estudio comparado de la coloración de *P. algirus* en tres poblaciones de Cataluña, encontrando cierto grado de diferenciación poblacional y dimorfismo sexual en diversos rasgos, muchos de los cuales a su vez estaban correlacionados con el tamaño corporal. Sin embargo, los resultados más destacables de este trabajo fueron los relativos al patrón de coloración de la garganta y

su distribución por sexos en las poblaciones estudiadas al NE de España (gargantas amarillas en machos y hembras, con algo de rojo en las escamas infralabiales de los machos), que difería totalmente del presente en las poblaciones del centro de la Península (gargantas rojo-anaranjadas en los machos, sobre todo en los de mayor tamaño y probablemente de más edad, y gargantas amarillas en las hembras de mayor tamaño). Así mismo, este autor destaca que la presencia de una línea vertebral oscura o, más en general, el patrón de coloración rayado, aunque no es la norma en las poblaciones de *P. algirus* de otras regiones de la Península (Barbadillo 1999), caracteriza a las poblaciones de ambientes esteparios y arenales costeros. De esta forma, anticipa el patrón general que se documenta y discute en el Capítulo 6 de esta memoria.

4.4. Contexto del presente estudio

En vista de la revisión bibliográfica del apartado anterior, es claro que hasta ahora muy pocos estudios han combinado datos genéticos y de diferenciación fenotípica entre poblaciones de *P. algirus* (algo que sí se ha intentado para *P. hispanicus*, una especie mucho menos abundante y de distribución más parcheada; véase Fitze et al. 2011). Como excepción, cabe mencionar los trabajos de Busack y Lawson (2006) y Busack et al. (2006); sin embargo, las limitaciones metodológicas de estos estudios han impedido obtener una solución consensuada acerca de la historia evolutiva de las poblaciones de lagartija colilarga y de su situación en la actualidad. En lo referente al trabajo de Busack y Lawson (2006) hay que destacar el carácter poco representativo del conjunto de poblaciones de *P. algirus* muestreadas en Europa y África (solo cuatro localidades en España y cinco en Marruecos; véase la Figura 1 de Busack y Lawson 2006), el escaso número de individuos analizados (un total de 14 ejemplares para datos de ADN mitocondrial, 25 para alozimas y 8 con datos de ambos marcadores) y el escaso soporte de los árboles filogenéticos obtenidos. En consecuencia, la posterior descripción de *P. manulae* y *P. jeanneae* como especies distintas de *P. algirus* (Busack et al. 2006) parece una decisión precipitada, o al menos merecedora de una revisión más detallada con un mayor número de ejemplares y localidades, ya que los análisis de Busack y Lawson (2006) podrían no haber captado con suficiente precisión la estructura filogeográfica de las poblaciones de *P. algirus*.

Por otro lado, y por lo que concierne a los estudios comparados sobre historia natural de *P. algirus*, en los pocos casos en los que se incluyen dos poblaciones distintas

(Iraeta et al. 2006, 2008, 2010, 2011, 2012 y 2013, Díaz 1997, Díaz et al. 2006 y 2007), los únicos resultados relativos a aspectos genéticos son los de los experimentos de entorno común (*common garden*), que permiten distinguir las fuentes de variación ambientales y genéticas, y que normalmente han asumido que los posibles efectos genéticos sobre el fenotipo son el resultado de procesos locales de adaptación. En particular, Iraeta et al. (2006) controlaron los efectos familiares en un experimento de trasplante recíproco entre dos localidades de llanura y de montaña y demostraron que, independientemente de su origen, y aunque el crecimiento medio fuera mayor para los juveniles procedentes de puestas de llanura, los juveniles criados en el ambiente de montaña crecían más deprisa y alcanzaban un mayor tamaño que sus medio-hermanos criados en el ambiente de llanura.

5.- Objetivos específicos

Dentro de este marco conceptual, el objetivo de esta memoria es investigar los factores que han influido en el origen y el mantenimiento de la diversidad fenotípica en *P. algirus*, incluyendo el aislamiento geográfico en refugios plio-pleistocénicos separados y, en relación con los efectos ambientales, los procesos de adaptación local y/o plasticidad fenotípica. Por motivos logísticos relacionados con el muestreo y el esfuerzo de captura, en este estudio nos centraremos exclusivamente en las poblaciones ibéricas de *P. algirus*; además, y en función de la información disponible sobre los niveles de variabilidad genética (Carranza et al. 2006, Pina Martins 2007), parece que los procesos más interesantes desde el punto de vista evolutivo han tenido lugar en la Península. Así, las poblaciones africanas solo serán empleadas en los análisis filogeográficos preliminares de orientación sobre todo taxonómica, pero no en los análisis fenotípicos. Sin embargo, para el conjunto de poblaciones ibéricas trataremos de reunir y combinar datos filogeográficos, genéticos y fenotípicos con los siguientes objetivos:

- Esclarecer la sistemática de *Psammodromus algirus*. El mantenimiento o no de *P. manuelae* y *P. jeanneae* como especies válidas y distintas de *P. algirus* requiere examinar las relaciones de parentesco de las dos especies propuestas (a ser posible utilizando sus holotipos, paratipos o topotipos) con poblaciones del resto del área de distribución de la lagartija colilarga, tanto en Iberia como en el Magreb.

- Proponer una historia filogeográfica en base a marcadores de ADN mitocondrial, tratando de identificar los principales linajes y/o clados estableciendo hipótesis acerca de los mecanismos que han podido originar la diferenciación ancestral en esta especie y los procesos de expansión que hayan podido experimentar sus poblaciones. Para ello se hace necesario un muestro más completo que el empleado en trabajos anteriores. Así mismo, y con objeto de definir la situación actual de flujo (vs. diferenciación) entre poblaciones y/o filogrupos, es recomendable contar no sólo con datos de ADN mitocondrial sino también con información de marcadores nucleares (por ejemplo microsátélites).
- Documentar los niveles en los que se manifiesta la diversidad fenotípica en esta especie, enfatizando especialmente, como ya se ha dicho, las estrategias vitales (*life histories*: tamaño de las hembras, huevos y juveniles, tiempo de incubación, tamaño de puesta, tasa de crecimiento) y la coloración dorsal, aunque sin despreciar algunos otros rasgos como la velocidad de carrera o la estrategia de huida.
- Evaluar el grado de ajuste fenotípico al ambiente, tratando de interpretar la variación fenotípica observada en términos de adaptación o, en su caso, plasticidad, relacionándola con gradientes ambientales de temperatura, precipitación, productividad, etc.

Para cumplir estos objetivos hemos estructurado nuestro estudio en distintos capítulos:

En el **Capítulo 2** aprovecharemos la publicación de los estudios filogeográficos con *Psammodromus algirus* (Carranza et al. 2006, Busack y Lawson 2006) y la posterior descripción de *P. manuae* y *P. jeanneae* (Busack et al. 2006) para revisar la taxonomía de esta especie en base a datos moleculares. Trataremos de combinar toda la información genética disponible, añadiendo datos inéditos de poblaciones del centro de la Península Ibérica, para comprobar si los dos linajes definidos por Carranza et al. (2006) coinciden de forma abrupta o gradual en el centro peninsular, asociar los taxones descritos por Busack et al. (2006) con los grupos filogeográficos existentes y evaluar su validez taxonómica en base a las relaciones de parentesco dentro de *P. algirus*.

El **Capítulo 3** estará dedicado a investigar la variabilidad existente en los rasgos reproductivos de las poblaciones ibéricas de *P. algirus*, y comprobar en qué medida dicha variabilidad se encuentra determinada por la diferenciación de los linajes mitocondriales descritos en el capítulo anterior. Para ello, analizaremos los datos climatológicos y las principales variables asociadas con las estrategias reproductivas (como el tiempo de incubación, el peso del huevo o la fecundidad relativa, entre otros) en quince poblaciones de los linajes ibéricos, para tratar de interpretar la variación observada en un contexto filogeográfico y de correlación con los gradientes ambientales.

En el **Capítulo 4** diseñaremos un experimento para comprobar las respuestas de los dos linajes mitocondriales a idénticas condiciones de incubación en el laboratorio, con el objetivo de investigar la posible adaptación de los dos grupos a distintos niveles de temperatura y humedad durante la etapa embrionaria. Para conseguir tal objetivo, capturaremos hembras grávidas de cuatro poblaciones (dos del linaje occidental y dos del linaje oriental, siendo en ambos casos una localidad mesomediterránea y la otra supramediterránea), incubaremos los huevos bajo tratamientos cruzados de temperatura y humedad, y mediremos diversos aspectos de la viabilidad y morfología de los juveniles para comprobar el posible efecto de estas dos variables ambientales sobre la *fitness* de las lagartijas en la etapa post-natal.

El **Capítulo 5** tratará de profundizar en la estructura genética de las poblaciones ibéricas de *P. algirus* mediante un muestreo más completo y exhaustivo, con el empleo de dos tipos de marcadores genéticos: secuencias de ADN mitocondrial (para describir la historia, extensión y complejidad de los principales filogrupos –linajes y clados– del Capítulo 2) y datos de microsatélites (para investigar la existencia de flujo génico entre las poblaciones). Prestaremos especial atención a la situación actual de la zona central de la Península, dadas las evidencias acerca de su papel como zona de contacto secundaria entre los dos linajes mitocondriales, y trataremos de interpretar las causas históricas y ecológicas que pueden dar razón de los patrones de flujo existentes.

Finalmente, el **Capítulo 6** investigará la distribución geográfica del patrón de coloración dorsal de *P. algirus*, su grado de asociación con los clados descritos en el Capítulo 5, y su aspecto funcional relacionado con la capacidad críptica de las lagartijas frente a posibles depredadores aéreos. Diseñaremos experimentos para evaluar los

tiempos de detección de lagartijas con distintos fenotipos (“rayado” vs. “no rayado”) en entornos propios y foráneos, con fotografías tomadas de forma realista en el campo y presentadas posteriormente a un grupo de observadores humanos. Los resultados nos permitirán discutir la evolución de los fenotipos mapeando su distribución sobre los clados definidos por la antigua señal filogenética y considerando su papel como adaptación encaminada a disminuir el riesgo de depredación.

II. Capítulo 2

Nuevos datos sobre la filogeografía de *Psammodromus algirus*: implicaciones sistemáticas

Este Capítulo reproduce íntegramente el siguiente manuscrito:

Verdú-Ricoy, J., Carranza, S., Salvador, A., Busack, S.D., Díaz, J.A. (2010). Phylogeography of *Psammodromus algirus* (Lacertidae) revisited: systematic implications. *Amphibia-Reptilia* **31**: 576-582.

Nuevos datos sobre la filogeografía de *Psammodromus algirus*: implicaciones sistemáticas

Resumen. Se han estimado mediante secuencias de genes mitocondriales las relaciones filogeográficas y de parentesco entre un amplio número de poblaciones de *Psammodromus algirus* de la Península Ibérica y del Norte de África, incluyendo las recientemente descritas *P. jeanneae* y *P. manuelae*. Esta base de datos ampliada confirmó la presencia de dos linajes mitocondriales divergentes en la Península Ibérica, uno oriental y otro occidental, cuyas distribuciones están separadas por una estrecha zona de contacto a lo largo del centro de la Península. El holotipo y un paratipo de *P. jeanneae*, y dos topotipos de *P. manuelae*, representan respectivamente los clados sur y norte del linaje occidental, convirtiendo a *P. algirus* en un taxón parafilético. Esto, unido al bajo nivel de subestructura en alozimas y ADN mitocondrial dentro de las poblaciones occidentales, hace aconsejable no mantener a *P. jeanneae* y *P. manuelae* como especies válidas, por lo que estos nombres quedan relegados a sinónimos de *P. algirus*.

Introducción

Desde su descripción original en 1758, *Psammodromus algirus* ha sido considerada una especie única y monotípica en la Península Ibérica y el Norte de África. Sin embargo, recientemente Carranza et al. (2006) demostraron que en Iberia *P. algirus* está constituida por dos clados definidos a partir de secuencias de ADN mitocondrial, uno oriental y otro occidental. Trabajando de forma independiente a Carranza et al. (2006), Busack y Lawson (2006) observaron diferenciación en el ADN mitocondrial y en alozimas entre poblaciones ibéricas del norte y del sur, y describieron *P. manuelae* de Manzanares el Real (Madrid) y *P. jeanneae* de 25.6 km al NE de Facinas (Cádiz) en base a un análisis morfológico (Busack et al. 2006). En este análisis utilizamos secuencias de ADN de siete genes mitocondriales y aprovechamos una muestra mayor y más fiable de especímenes, incluyendo el holotipo y un paratipo de *P. jeanneae*, así como dos topotipos de *P. manuelae*, para revisar la filogeografía de *P. algirus* en la Península Ibérica. Esta base de datos ampliada nos permite inferir las relaciones genéticas entre las poblaciones de *P. algirus*, *P. manuelae* y *P. jeanneae* a lo largo de gran parte de su área de distribución ibérica y revisar la taxonomía del grupo, con especial referencia al estatus de *P. manuelae* y *P. jeanneae*.

Material y métodos

Se secuenció un total de 104 individuos de 68 poblaciones, incluyendo muchas muestras empleadas por Carranza et al. (2006) y Busack y Lawson (2006), el holotipo y un paratipo de *Psammodromus jeanneae* (E232055 y 232056, respectivamente), dos topotipos de *P. manuelae* (E232060 y 232062) y 32 especímenes de 16 poblaciones que no se habían muestreado previamente (Figura 2.1). Un ejemplar de *Psammodromus h. hispanicus* de Encinasola (Huelva) y otro de *P. h. edwardsianus* de la Sierra de Baza (Granada) sirvieron como grupos externos (siguiendo a Carranza et al. 2006).

El ADN se extrajo a partir de aproximadamente 40 mg de tejido empleando el Kit BioSprint 15 DNA® de Qiagen y siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN obtenido se inspeccionó visualmente mediante migración en geles de agarosa y se cuantificó con un espectofotómetro NanoDrop. Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen total de 50 µl con 1x buffer de reacción, 2 mM de MgCl₂, 0.4 µM de cada primer, 0.2 mM de cada dNTP, 1.25 U de Go-Taq Flexi DNA polimerasa (Promega), y 3 µl del ADN previamente extraído (50-100 ng). Un fragmento de 709 pares de bases (pb) del gen mitocondrial de la cuarta subunidad de la NADH deshidrogenasa (ND4) y de los genes adyacentes ARNt^{His} (histidina, 68 bp), ARNt^{Ser} (serina, 67 bp) y ARNt^{Leu} (leucina, 48 bp) se amplificó usando los *primers* ND4 y Leu (Arévalo et al. 1994). Las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización de 3 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, ligamiento de *primers* durante 30 segundos a 54 °C y elongación durante 40 segundos a 72 °C, con un paso final de elongación de 4 minutos a 72 °C. Los fragmentos de los genes mitocondriales citocromo b (CytB, 300 pb), ARNr 12S (363 pb) y ARNr 16S (410 pb) se amplificaron usando los *primers* cytb1 y cytb2 (Palumbi 1996), 12Sa y 12Sb (Kocher et al. 1989), y 16Sa y 16Sb (Palumbi 1996), respectivamente. Las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, ligamiento de *primers* durante 45 segundos a 48 °C y elongación durante 1 minuto a 72 °C, con un paso final de elongación de 5 minutos a 72 °C. La efectividad de las PCR se cuantificó visualmente tras la migración de los productos de PCR en geles de agarosa. Los productos de PCR fueron purificados mediante un proceso de limpieza con acetato de amonio y etanol y secuenciados mediante el protocolo de secuenciación ABI Prism Big Dye Terminator Cycle en un secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

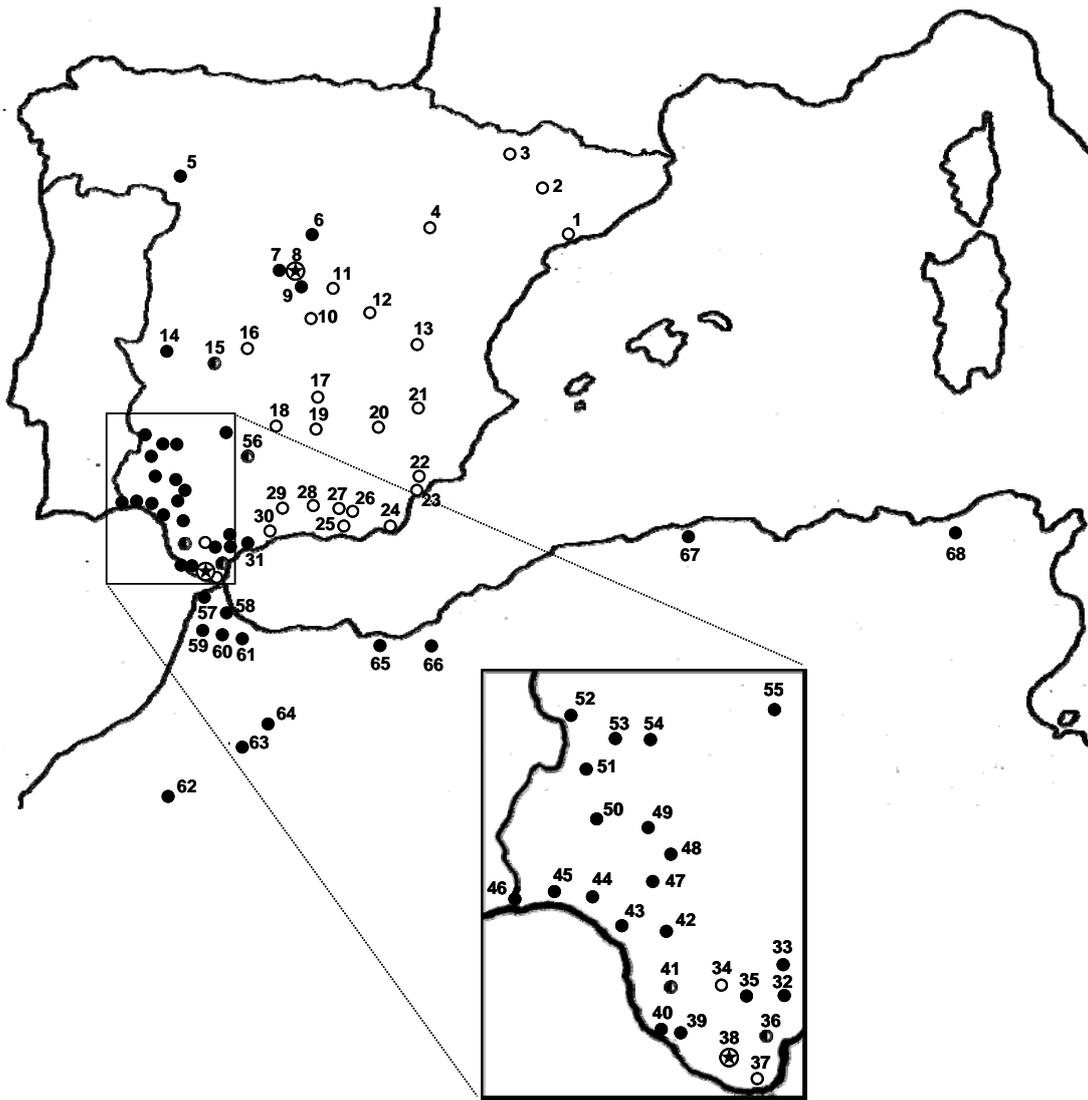


Figura 2.1. Localidades muestreadas. Los círculos negros representan al linaje occidental, los círculos blancos representan al linaje oriental, y los círculos con ambos colores indican las localidades en las que están representados ambos linajes (las localidades tipo para *P. manuelae* [8] y *P. jeanneae* [38] están señaladas con asteriscos). Clave de localidades: **ESPAÑA:** TARRAGONA: (1) Tarragona. LÉRIDA: (2) Tartareu. HUESCA: (3) Ainsa. ZARAGOZA: (4) El Frasno. ZAMORA: (5) Cabañas de Tera. SEGOVIA: (6) Sotos de Sepúlveda. MADRID: (7) Navacerrada, (8) Manzanares el Real, (9) El Pardo, (10) Aranjuez. GUADALAJARA: (11) Pioz. CUENCA: (12) Torrejuncillo del Rey, (13) Hoces del Cabriel. CÁCERES: (14) Santiago del Campo, (15) Villuercas. TOLEDO: (16) Espinoso del Rey. CIUDAD REAL: (17) Valdepeñas, (18) Solana del Pino. JAÉN: (19) Despeñaperros. ALBACETE: (20) Embalse de Fuensanta, (21) Embalse de Bayco. MURCIA: (22) Morata, (23) Águilas. ALMERÍA: (24) Cabo de Gata, (25) Sierra Gador, (26) Abrucena. GRANADA: (27) La Calahorra, (28) Cortijo del Ciprés, (29) Dehesa de los Montes. MÁLAGA: (30) Málaga, (31) Marbella, (32) Sierra Bermeja, (33) Genaguacil, (34) La Saucedá, (35) Río Hozgarganta. CÁDIZ: (36) Castellar de la Frontera, (37) Getares, (38) Facinas, (39) Barbate, (40) Caños de Meca, (41) Medina Sidonia. SEVILLA: (42) Lebrija, (47) Cañada de los Pájaros, (48) Gelves, (49) Gerena. HUELVA: (43) Matalascañas, (44) Bodegones, (45) El Portil, (46) Ayamonte, (50) Berrocal, (51) Linares de la Sierra. BADAJOZ: (52) Oliva de la Frontera, (53) Tentudía, (54) Pallarés. CÓRDOBA: (55) Doña Rama, (56) Virgen de la Cabeza. **MARRUECOS:** (57) Tànger, (58) Ued Lau, (59) Chefchauen, (60) Jebala, (61) Bab-Berret, (62) Beni-Mellal, (63) Boulemane, (64) Atlas medio, (65) Berkana. **ARGELIA:** (66) Tlemcen, (67) Sidi Feredj. **TÚNEZ:** (68) Ain Draham.

Los cromatogramas de todas las secuencias fueron editados con Sequencer (v. 4.2.2, Gene Codes). Una vez corregidas, las secuencias fueron alineadas de forma independiente para cada gen con CLUSTALX (Thompson et al. 1997) bajo los parámetros por defecto del programa (penalización por apertura de hueco = 10; penalización por extensión de hueco = 0.2) y visualmente inspeccionadas con BIOEDIT v.7.0.5 (Hall 2005). La incongruencia topológica entre las particiones fue examinada utilizando el test ILD (*incongruence length difference*, Michkevich y Farris 1981; Farris et al. 1994), mediante 10.000 búsquedas heurísticas que se llevaron a cabo tras eliminar todas las posiciones invariables de las bases de datos (Cunningham 1997). Para evaluar la incongruencia entre bases de datos, usamos una proporción recíproca de *bootstrap* del 70% o un umbral para probabilidades posteriores del 95% (Mason-Gamer y Kellogg 1996). Los conflictos topológicos se consideraron significativos si dos relaciones distintas para el mismo conjunto de taxones (secuencias) gozaban ambas de soporte. Los resultados de todos los tests indicaron que las distintas bases de datos no eran incongruentes, por lo que se llevó a cabo un análisis global combinando los 7 genes mitocondriales (ND4, ARNt^{His}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Leu}, CytB, 12S y 16S). Para muchas de las muestras, sin embargo, no fue posible amplificar los genes 12S y 16S, por lo que se elaboró una base de datos más amplia con un concatenado de secuencias más pequeño que incluía solo 5 genes mitocondriales (ND4, ARNt^{His}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Leu} y CytB).

Los árboles filogenéticos se construyeron usando métodos de máxima verosimilitud (ML; Felsenstein 1981) y métodos bayesianos. El modelo más apropiado de evolución de las secuencias se determinó con jModelTest v.0.1.1 (Posada 2008) empleando el criterio de información de Akaike (AIC). En los análisis bayesianos cada partición posee su propio modelo evolutivo; éstos fueron: HKY para ARNt^{His} y ARNt^{Leu}, HKY+G para ARNt^{Ser} y 16S, GTR+G para ND4 y 12S, y GTR+I+G para CytB. Los análisis de ML fueron realizados con PhyML v.2.4.3 (Guindon y Gascuel 2003), con los parámetros del modelo ajustados a los datos por maximización de la probabilidad. En este caso, un único modelo de evolución de secuencia fue seleccionado para cada uno de los concatenados (de 5 y 7 genes). En ambos casos, el mejor modelo fue el GTR+I+G. La fiabilidad de los árboles obtenidos mediante ML fue evaluada con un análisis de *bootstrap* de 1.000 replicaciones (Felsenstein 1985b). Los análisis bayesianos se realizaron con MrBayes v3.0b4 (Huelsenbeck y Ronquist 2001; Ronquist y Huelsenbeck 2003) para 2.5×10^6 generaciones, con una frecuencia de muestreo cada

100 generaciones. Tras verificar que se había alcanzado una situación estacionaria en la estimación de los parámetros y en los valores de probabilidad, y una vez descartados los primeros 5.000 árboles en los análisis de los dos concatenados, se obtuvieron dos árboles de consenso independientes con los árboles restantes usando la regla de la mayoría. La frecuencia de un clado particular en el árbol de consenso representa la probabilidad posterior para ese nodo (Huelsenbeck y Ronquist 2001); solo los valores iguales o mayores que el 95% se consideraron indicativos de un soporte significativo (Wilcox et al. 2002).

Resultados y discusión

El test ILD indicó que las 7 particiones de los genes (ND4, ARNt^{His}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Leu}, CytB, 12S y 16S) no eran incongruentes ($P = 0.23$); los análisis de las particiones independientes confirmaron que no había conflictos topológicos (Mason-Gamer y Kellogg 1996), de forma que se obtuvieron dos conjuntos independientes de fragmentos de ADN mitocondrial que fueron combinados para su análisis posterior. El primer conjunto incluyó un total de 1192 pb para ND4-ARNt^{His}-ARNt^{Ser}-ARNt^{Leu}-CytB de 104 individuos, de los que 318 pb fueron variables y 236 informativos según el criterio de parsimonia. El segundo estuvo formado por 1965 pb de ND4-ARNt^{His}-ARNt^{Ser}-ARNt^{Leu}-CytB-12S-16S de 46 individuos, de los que 459 pb eran variables y 319 pb informativos según el criterio de parsimonia. Todas las secuencias actualmente no disponibles en GenBank serán añadidas tras la publicación (véanse las Figuras 2.2 y 2.3 para obtener información sobre la identificación de los especímenes).

Los resultados de los análisis de máxima verosimilitud (ML) y bayesianos aparecen ilustrados en la Figura 2.2 (ND4-ARNt^{His}-ARNt^{Ser}-ARNt^{Leu}-CytB) y en la Figura 2.3 (ND4-ARNt^{His}-ARNt^{Ser}-ARNt^{Leu}-CytB-12S-16S). Todos los métodos produjeron árboles con topologías muy similares para los concatenados. Los valores de *log-likelihood* de los árboles obtenidos por ML para los combinados ND4-ARNt^{His}-ARNt^{Ser}-ARNt^{Leu}-CytB y para ND4-ARNt^{His}-ARNt^{Ser}-ARNt^{Leu}-CytB-12S-16S fueron -5824.03 y -6584.01 , respectivamente.

Estos datos confirman que *Psammodromus algirus* se compone de dos linajes mitocondriales con buen soporte y recíprocamente monofiléticos (Carranza et al. 2006):

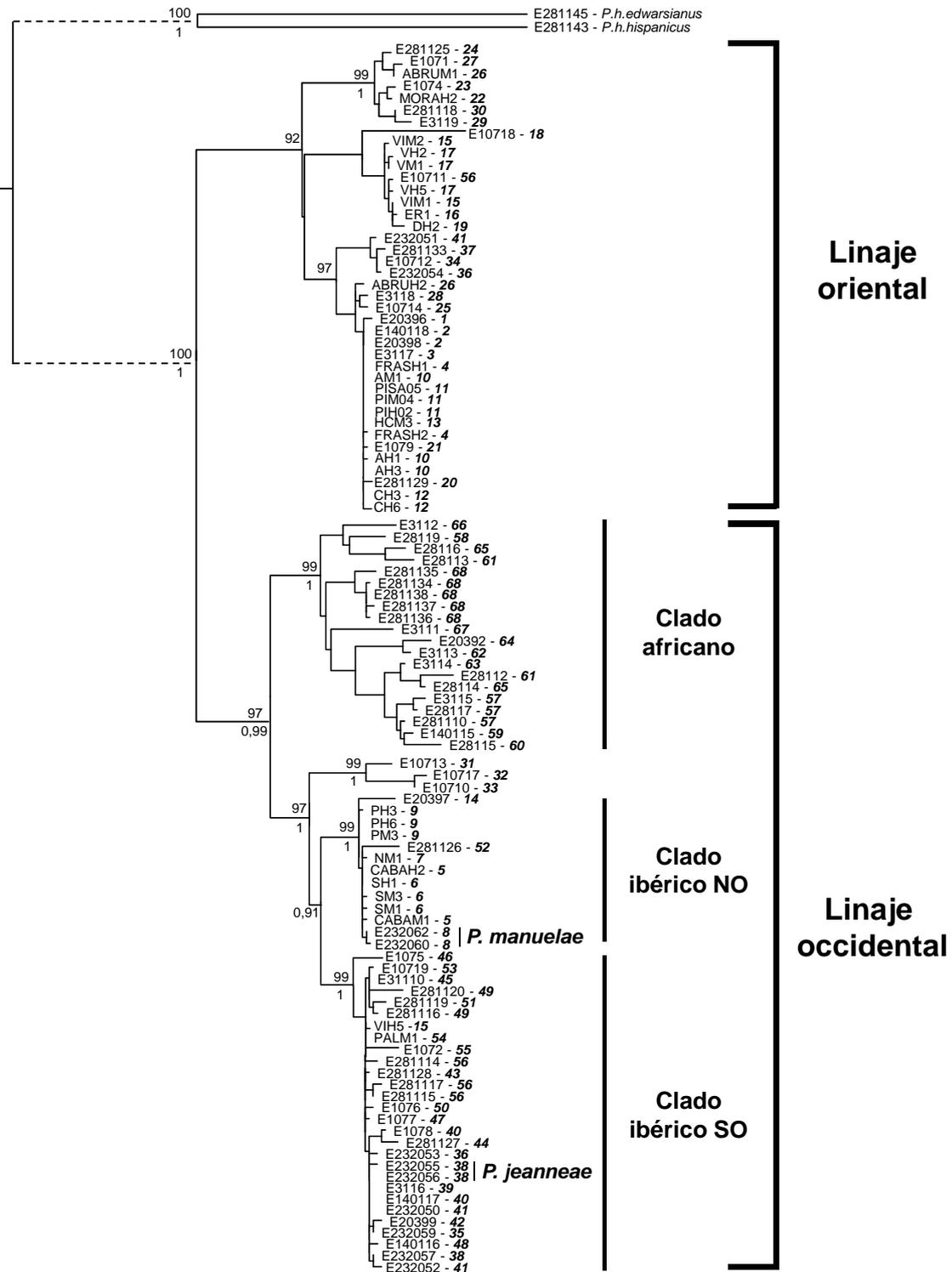


Figura 2.2. Relaciones filogenéticas de *Psammmodromus algirus*, *P. jeanneae* y *P. manuelae* derivadas de análisis de máxima verosimilitud (ML) y bayesianos de ND4, ARN^{HIS}, ARN^{Ser}, ARN^{Leu} y CytB (véase el texto para más detalles). Los números por encima y por debajo de los nodos representan respectivamente el apoyo de bootstrap (>70%) para los análisis ML y las probabilidades posteriores (>0.95) para los análisis bayesianos (no mostrados en los nodos con politomías). Las líneas discontinuas indican longitudes de ramas basales no proporcionales al número total de cambios. Se indican la identidad de los individuos muestreados y, con números en negrita, las localidades correspondientes según la numeración asignada en la figura 2.1.

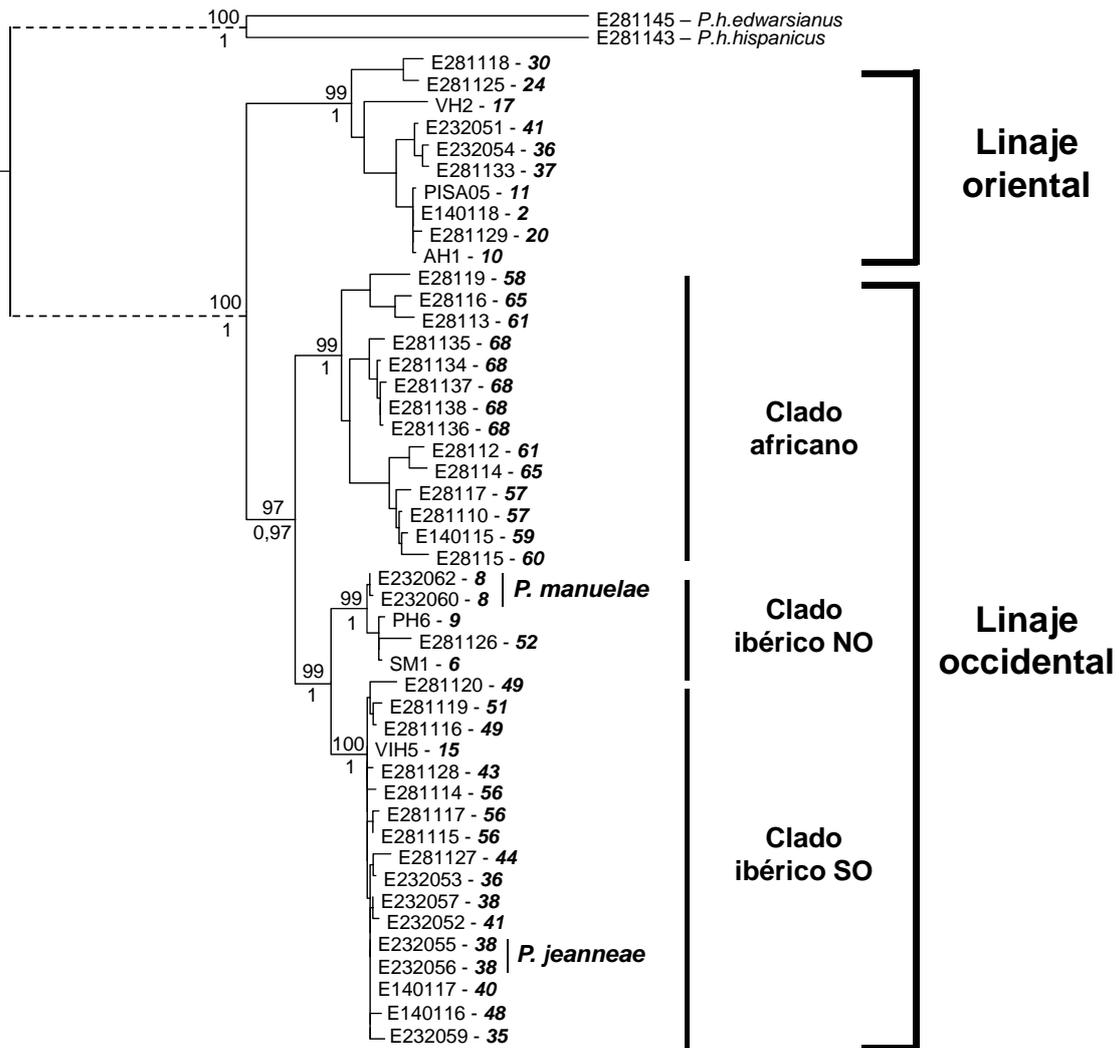


Figura 2.3. Estima de las relaciones de parentesco entre *Psammodromus algirus*, *P. jeanneae* y *P. manuelae* derivada de análisis de máxima verosimilitud (ML) y bayesianos de ND4, ARNt^{His}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Leu}, CytB, 12S y 16S (véase el texto para más detalles). Los números por encima y por debajo de los nodos representan respectivamente el apoyo de *bootstrap* (>70%) para los análisis ML y las probabilidades posteriores (>0.95) para los análisis bayesianos (no mostrados en los nodos con politomías). Las líneas discontinuas indican longitudes de ramas basales no proporcionales al número total de cambios. Se indican la identidad de los individuos muestreados y, con números en negrita, las localidades correspondientes según la numeración asignada en la figura 2.1.

un linaje oriental confinado a la Península Ibérica, y un linaje occidental presente tanto en la Península Ibérica como en el Norte de África (Figuras 2.1, 2.2 y 2.3). Este nuevo análisis, que incluye una muestra mayor y geográficamente más representativa de individuos, y un fragmento más amplio de ADN mitocondrial que el empleado por Carranza et al. (2006), apoya firmemente al clado africano como grupo hermano del linaje occidental ibérico. Los representantes ibéricos del linaje occidental están repartidos en tres grupos: un clado basal restringido a tres muestras de localidades

meridionales (todas en la provincia de Málaga, cerca de la frontera con Cádiz), y dos clados principales, uno noroccidental y otro sudoccidental (Figuras 2.2 y 2.3). La colonización del continente africano tuvo lugar tras la diferenciación entre los linajes occidental y oriental en la Península Ibérica, pero antes de la división de los clados sudoccidental y noroccidental dentro del linaje occidental.

Los análisis filogenéticos sitúan de forma clara a los especímenes tipo de *Psammodromus jeanneae*, procedente de 25.6 km al NE de Facinas (Cádiz), en el clado sudoccidental del linaje occidental, y a los especímenes de *P. manuelae* procedente de Manzanares el Real (la localidad tipo, 37 km al NO de Madrid) en el clado noroccidental (Figuras 2.2 y 2.3). Si *P. jeanneae* y *P. manuelae* fueran, de hecho, especies bien diferenciadas, *P. algirus* sería una unidad parafilética. Sin embargo, dentro del clado occidental, cuyas poblaciones africanas se asocian al taxón *P. algirus*, el nivel de subestructura genética es mucho menor que el que existe entre los clados occidental y oriental (Carranza et al. 2006, Fitze et al. 2011 y resultados de este capítulo), por lo que nuestros datos moleculares (Figuras 2.2 y 2.3) no apoyan a *P. jeanneae* y *P. manuelae* como especies bien diferenciadas. En consecuencia, relegamos estos taxones al estatus de sinónimos de *P. algirus*.

Nuestra mayor cobertura geográfica, en relación a la presentada por Carranza et al. (2006) y por Busack y Lawson (2006), nos permite rechazar la hipótesis de una variación gradual en los haplotipos mitocondriales estudiados. Es más: existen datos que sugieren patrones de coloración altamente divergentes en poblaciones de *P. algirus* del centro de España y en tres poblaciones nororientales (Carretero 2002). Si tales (u otras) diferencias fenotípicas fueran consistentes con una escala geográfica más amplia, el linaje oriental de *P. algirus*, o al menos parte de él (Capítulo 6), podría representar una especie diferente. En conjunto, la nueva información presentada en este capítulo sugiere que debe haber mecanismos ecológicos y/o comportamentales que estén contribuyendo a mantener la diferenciación, dando como resultado una zona de contacto relativamente estrecha entre poblaciones orientales y occidentales a lo largo del centro de la Península Ibérica (Figura 2.1). Resulta evidente que son necesarios nuevos datos, incluyendo marcadores nucleares (Godinho et al. 2008) y nuevos análisis morfométricos, para mejorar nuestra comprensión de la variación genética, filogeográfica y fenotípica entre y dentro de los linajes oriental y occidental de *P. algirus*, especialmente en las zonas de contacto.

III. Capítulo 3

Variación intraespecífica de los caracteres reproductivos: diferencias entre puestas, poblaciones y linajes

Este Capítulo reproduce íntegramente el siguiente manuscrito:

Díaz, J.A., Iraeta, P., Verdú-Ricoy, J., Siliceo, I., Salvador, A. (2012). Intraspecific variation of reproductive traits in a Mediterranean lizard: clutch, population, and lineage effects. *Evolutionary Biology* **39**: 106-115.

Variación intraespecífica de los caracteres reproductivos: diferencias entre puestas, poblaciones y linajes

Resumen. Los ectotermos terrestres ampliamente distribuidos de las penínsulas meridionales europeas muestran patrones de subdivisión (relacionados con el aislamiento en refugios templados) que nos permiten evaluar la importancia relativa del linaje filogeográfico, la población de origen y los efectos familiares como fuentes de variación para los rasgos de las estrategias vitales. Se capturaron hembras grávidas de 15 poblaciones geográficamente separadas del lacértido *Psammotromus algirus*, una especie ampliamente distribuida con un linaje oriental y otro occidental bien diferenciados. Se incubaron los huevos bajo dos tratamientos de temperatura, uno constante (28 °C) y otro de temperatura fluctuante (28 ± 4 °C), y se examinaron los efectos del linaje, de la población y de la puesta sobre varios rasgos de las hembras, los huevos y los juveniles. El tiempo de incubación fue principalmente explicado atendiendo a las diferencias entre linajes, pero también estuvo influenciado por diferencias entre poblaciones y entre hembras de una misma población. Dentro de cada linaje, la incubación fue más corta en los sitios más fríos y húmedos, y para un clima dado, fue más corta para las poblaciones orientales que para las occidentales, sugiriendo procesos de variación contragradiente que habrían evolucionado de forma independiente en los dos linajes. El tamaño de la hembra, el tamaño de la puesta y la fecundidad relativa fueron principalmente explicados por las diferencias entre poblaciones, un patrón que parece atribuible a las diferencias ambientales en productividad, ya que el tamaño medio de las hembras estuvo correlacionado de forma positiva con un gradiente de precipitación creciente y temperatura decreciente. El tamaño de la puesta resultó depender del tamaño de la hembra, aunque no exclusivamente, sugiriendo tanto efectos próximos de las condiciones locales como diferencias intrínsecas entre las poblaciones. Las hembras de sitios más cálidos y secos produjeron juveniles más grandes. El peso medio del huevo estuvo determinado principalmente por efectos familiares. Los huevos incubados a temperaturas constantes eclosionaron antes que sus hermanos incubados a temperaturas fluctuantes, un hecho que podría ser explicado considerando que en los ambientes mediterráneos la tasa de desarrollo podría aumentar a menor velocidad por encima de la temperatura media de incubación que lo que decrecería por debajo de la misma.

Introducción

Las estrategias vitales pueden ser definidas como conjuntos de rasgos coadaptados que determinan cuanta energía destina un organismo a la reproducción, frente a las demandas competidoras de mantenimiento y crecimiento, y cómo esa inversión reproductiva se divide entre propágulos individuales (Stearns 1992, Roff 1992). Estas combinaciones de rasgos se suponen ajustadas al ambiente por selección natural. Por ejemplo, los modelos teóricos predicen que, incluso una vez que los recursos destinados a la reproducción se han fijado, la selección natural puede todavía dar forma al reparto de esa inversión en pocos propágulos grandes o muchos propágulos pequeños (Lack 1954, Sinervo y Licht 1991, Stearns 1992). Si los juveniles sufren tasas de mortalidad altas, la estrategia de producir más propágulos de menor tamaño debería seleccionarse, mientras que en ambientes donde los juveniles de mayor tamaño poseen una clara ventaja en la supervivencia, el tamaño medio de los propágulos debería aumentar, y el tamaño de la puesta disminuir (Sinervo 1990). En especies ovíparas, otro rasgo que posee consecuencias evolutivas importantes y que de hecho responde con rapidez a los gradientes ambientales es el tiempo de incubación, que tiende a acortarse en climas fríos hasta la eventual evolución del viviparismo (Shine 1983, 2005; Telemeco et al. 2010). Así, la variación en los rasgos reproductivos se encuentra ampliamente distribuida, y abarca todos los niveles de organización biológica, desde individuos a poblaciones, especies, y taxones superiores. Por tanto, es importante cuantificar la cantidad relativa de variación que se asocia con cada uno de estos niveles, y establecer qué parte de la misma es más probable que represente efectos filogenéticos, genéticos y/o ambientales.

Para conseguir este objetivo se pueden emplear varios procedimientos. En el nivel interespecífico, el análisis de la variación fenotípica con métodos filogenéticos comparados ha sido predominante en la bibliografía (Felsenstein 1985a, Harvey y Pagel 1991). Estos métodos nos permiten distinguir si la compartición de rasgos reproductivos similares se debe a una ancestría común, o a convergencia adaptativa o plasticidad (Felsenstein 1985a, Miles y Dunham 1992, Bauwens y Díaz-Uriarte 1997, Siliceo y Díaz 2010). En el nivel intraespecífico, los experimentos de entorno común (*common garden*) y las aproximaciones de trasplante recíproco permiten discriminar entre fuentes de variación ambientales y fuentes de variación intrínsecas (posiblemente genéticas) de las poblaciones examinadas a la hora de explicar la variación geográfica de los

fenotipos (Qualls y Shine 2000, Lorenzon et al. 2001, Iraeta et al. 2006). Además, la reproducción en cautividad de hembras capturadas en el campo permite estimar efectos familiares dentro de las poblaciones. Por otro lado, las filogenias moleculares intraespecíficas, cada vez más comunes, aportan información sobre la historia filogeográfica de las poblaciones (Avice 1989), permitiéndonos investigar el papel de la ancestría en la diferenciación poblacional.

Los reptiles escamosos (Squamata) representan excelentes modelos para estudiar la evolución de las estrategias vitales porque dos de las principales consecuencias de la ectotermia en el medio terrestre -la escasa demanda de energía y el comportamiento termorregulador- han tenido grandes efectos evolutivos (Shine 2005). Por ejemplo, las hembras reproductoras pueden manipular las temperaturas de incubación ya sea seleccionando sitios apropiados para depositar la puesta (Shine y Harlow 1996, Iraeta et al. 2007) o reteniendo los huevos en desarrollo, lo que ha dado lugar a múltiples transiciones del oviparismo al viviparismo a lo largo de la evolución del grupo. Además, la ausencia de las restricciones que la conservación del calor impone al tamaño corporal de los endotermos, permite a los reptiles producir grandes cantidades de propágulos que pueden llegar a ser muy pequeños (Shine 2005). Esto facilita una dinámica sumamente activa de ajuste de las estrategias vitales al ambiente local, bien como resultado de efectos próximos (como oportunidades térmicas o disponibilidad de alimento), o bien bajo la forma de respuestas con una base genética a los regímenes selectivos geográficamente variables (Ballinger 1983, Sinervo y Adolph 1989, Adolph y Porter 1993, Ferguson y Talent 1993, Iraeta et al. 2006). Esta flexibilidad ha generado una enorme cantidad de variación intraespecífica, lo que ha llevado a un incremento en el número de estudios centrados en el nivel poblacional (por ejemplo, Adolph y Porter 1993, Forsman y Shine 1995a, Niewiarowski et al. 2004).

En este contexto, las especies de lacértidos que están ampliamente distribuidas en las penínsulas mediterráneas meridionales suministran una valiosa oportunidad de comprender las causas de la variación en los caracteres reproductivos. Las evidencias de marcadores moleculares indican que las Penínsulas Ibérica, Itálica y Balcánica funcionaron como refugios para muchas especies durante la época de las glaciaciones (Taberlet et al. 1998, Hewitt 1999). Los estudios de variación genética han mostrado patrones de subdivisión relacionados con el aislamiento en refugios templados durante las etapas glaciales, y expansiones demográficas y geográficas durante las etapas

interglaciares (Taberlet et al. 1998, Hewitt 1999, Milá et al. 2000, Lessa et al. 2003). Esta antigua diversificación se combina con la escasa capacidad de dispersión de los ectotermos terrestres, que deben adaptarse a las condiciones locales o rastrear las distribuciones cambiantes de los hábitats adecuados para ellos. Todo esto permite añadir una fuente adicional de variación a la hora de analizar la evolución de sus estrategias vitales.

En este estudio hemos capturado hembras grávidas de 15 poblaciones geográficamente separadas de *Psammodromus algirus*, abarcando gran parte del área de distribución ibérica de la especie, y hemos recogido datos climáticos de estaciones meteorológicas cercanas para enmarcar la variación intraespecífica en el contexto de los gradientes bioclimáticos que podrían contribuir a explicar dicha variación. La variación en caracteres reproductivos se ha documentando para *P. algirus*: estudios recientes han revelado efectos significativos de la fragmentación del hábitat en la inversión reproductiva (Díaz et al. 2005), diferencias en caracteres reproductivos entre poblaciones situadas en el núcleo y en la periferia del rango de distribución de la especie (Díaz et al. 2007), y variación en las tasas de crecimiento, el tamaño de puesta, el tamaño medio de los huevos, la duración de la incubación y el tamaño al nacer entre poblaciones cercanas situadas a diferente altitud (Iraeta et al. 2006, 2013).

Además, los datos moleculares muestran que *P. algirus* comprende dos linajes de ADN mitocondrial bien diferenciados y separados por una estrecha zona de contacto (Carranza et al. 2006, Capítulo 2), sugiriendo una divergencia ancestral reforzada por algún tipo de aislamiento entre los mismos. Aprovechando todo este conocimiento previo, examinamos las siguientes hipótesis: (1) puesto que las diferencias ambientales son la principal causa de la variación de las tasas de crecimiento, imponiéndose sobre los efectos familiares (Iraeta et al. 2006), esperamos que el tamaño corporal de las hembras y los rasgos reproductivos asociados (por ejemplo, el tamaño de puesta; Brandt y Navas 2011) estarán principalmente influenciados por las diferencias climáticas entre poblaciones; predecimos que los efectos poblacionales se impondrán sobre los atribuibles a la ancestría (representados por las diferencias entre linajes), con correlaciones positivas entre las medias poblacionales y las medidas de productividad ambiental; (2) puesto que los propágulos más grandes tendrán una ventaja selectiva de cara a la supervivencia en lugares en los que las condiciones para el crecimiento de los juveniles sean pobres (Roff 1992, Johnston y Leggett 2002, Iraeta et al. 2006, 2008),

proponemos la hipótesis de que el tamaño del huevo (y de los juveniles al eclosionar) variará entre poblaciones, haciendo que las medias poblacionales muestren correlaciones negativas con la productividad ambiental, y (3) puesto que el tiempo de incubación es fuertemente dependiente de la temperatura (Iraeta et al. 2007) y puede tener efectos importantes en la fecha de eclosión y por tanto en la eficacia biológica (Warner y Shine 2007), proponemos la hipótesis de que las lagartijas de sitios más fríos mostrarán tiempos de incubación más cortos para compensar las temperaturas de incubación más bajas (Oufiero y Angilletta 2006, Díaz et al. 2007).

Material y métodos

Especie de estudio

Psammodromus algirus es un lacértido de mediano tamaño (longitud cabeza-cloaca [LCC] en el adulto: 60-90 mm; peso 6-16 g), heliotérmico e insectívoro, que vive en zonas de bosque y matorral de la Península Ibérica, la región costera suroriental de Francia y el Noroeste de África (Arnold 1987, Díaz y Carrascal 1991). En el centro de España, su rango altitudinal es aproximadamente 450 - 1.400 m. La hibernación tiene lugar desde octubre hasta febrero. El cortejo y las puestas ocurren entre abril y junio, y los juveniles eclosionan entre agosto y septiembre (Veiga y Salvador 2001).

Sitios de estudio

Durante las primaveras de 2006, 2008 y 2009 se capturaron lagartijas adultas de 15 poblaciones a lo largo del rango de distribución de *Psammodromus algirus* en España (Figura 3.1, Tabla 3.1). Las secuencias de genes de ADN mitocondrial, tal como se ha indicado en la Introducción, permiten distinguir dos linajes divergentes, uno oriental y otro occidental, en la Península Ibérica (Carranza et al. 2006), cuyas distribuciones se encuentran separadas por una estrecha zona de contacto a lo largo del centro de la Península (Verdú-Ricoy et al. 2010). De nuestras 15 poblaciones, nueve pertenecen al linaje oriental, cinco pertenecen al linaje occidental, y una (Villuercas) posee haplotipos de ambos linajes (Figura 3.1). Para cada localidad, registramos la latitud, altitud, temperatura y precipitación medias durante el periodo activo de *P. algirus* (marzo – octubre). Estos datos se obtuvieron de las estaciones más próximas de la red de la Agencia Estatal de Meteorología de España (AEMET).

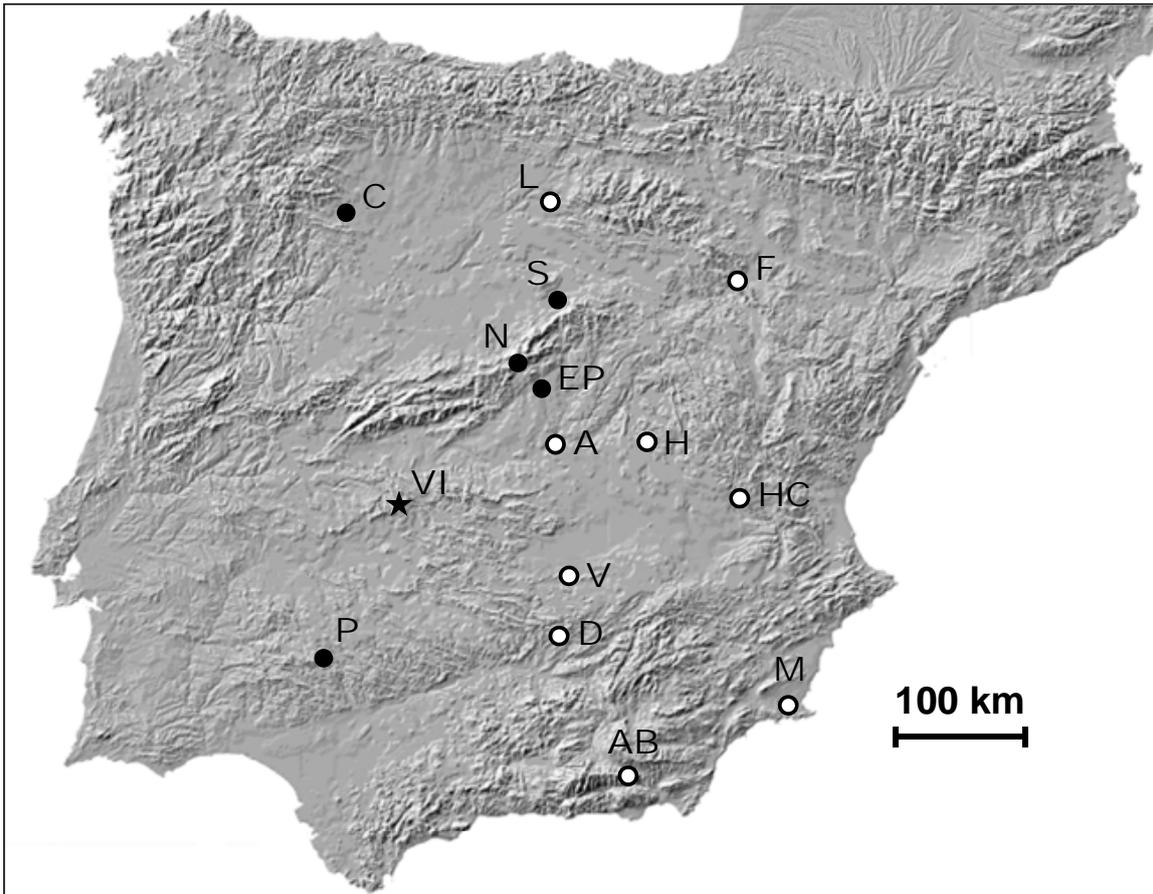


Figura 3.1. Poblaciones de *P. algirus* usadas en este capítulo. Zamora: Cabañas de Tera (C). Burgos: Lerma (L). Zaragoza: El Frasno (F). Segovia: Sotos de Sepúlveda (S). Madrid: Navacerrada (N), El Pardo (EP), Aranjuez (A). Cuenca: Horcajada de la Torre (H), Hoces de Cabriel (HC). Ciudad Real: Valdepeñas (V). Badajoz: Pallarés (P). Almería: Abrucena (AB). Murcia: Morata (M). Jaén: Despeñaperros (D). Cáceres: Villuercas (VI). Los círculos negros representan poblaciones del linaje occidental de ADN mitocondrial, mientras que los círculos blancos indican las localidades del linaje oriental. Villuercas (asterisco) posee haplotipos de ambos linajes.

Mantenimiento de los adultos, huevos y juveniles

Todos los individuos capturados fueron transportados al Departamento de Zoología de la Universidad Complutense de Madrid, donde fueron pesados y medidos (longitud cabeza-cloaca, LCC). Las lagartijas se colocaron en terrarios de paredes blancas opacas (dos hembras y un macho por terrario) cubiertos de una malla verde para prevenir escapes que permitía pasar la luz natural, y provistas de una teja y ramas secas a modo de refugio. Los terrarios se rellenaron con tierra humedecida recubierta de hojarasca. Una bombilla de 60 W fue suspendida en un extremo del terrario para crear un gradiente fototérmico (entre 25 - 50 °C) que permitiera la termorregulación dentro del rango preferido de temperaturas (Díaz y Cabezas-Díaz 2004). A las lagartijas se les

alimentó con grillos (*Acheta domesticus*) y larvas de escarabajo (*Tenebrio molitor*) espolvoreados con una vitamina comercial (ReptiVite®) y un suplemento de calcio. A todos los terrarios se les proporcionó agua *ad libitum*. En esta especie, las hembras grávidas ponen los huevos en cautividad sin ningún problema, al tiempo que su inversión reproductiva refleja las condiciones ambientales experimentadas en el campo durante las etapas iniciales de la vitelogénesis (es decir, cuando se produce la asociación fisiológica entre el tamaño de puesta, el tamaño del huevo y el peso de la puesta; Sinervo y Licht 1991). Las hembras grávidas fueron revisadas diariamente para detectar si habían puesto. Cuando una hembra realizaba una puesta era retirada del terrario y se procedía a una cuidadosa búsqueda de los huevos. Tras encontrar la puesta, los huevos eran contados, pesados e individualmente colocados en botes de plástico cerrados de 150 ml rellenos de aproximadamente 35 g de vermiculita humedecida (8 g de agua por cada 10 g de vermiculita, equivalente a -200 kPa; Tracy et al. 1978). Todas las puestas tuvieron lugar entre el 19 de mayo y el 29 de junio, y las hembras fueron soltadas en sus sitios de captura poco tiempo después de realizar sus puestas.

Utilizamos un diseño de puestas divididas para distribuir los huevos en dos incubadoras (Friocell, Königswinter, Alemania) ajustadas a una temperatura media de 28 °C, una de las cuales mantenía un tratamiento de temperatura constante (28 ± 0.1 °C) mientras la otra mantenía un ciclo térmico diario entre un valor mínimo de 24 °C entre las 0 y 6 horas, y un valor máximo de 32 °C entre las 10 y 16 horas (Figura 3.2). Este diseño tenía como objeto examinar los efectos de la varianza de la temperatura en el periodo de incubación y rasgos fenotípicos de los juveniles de diferentes puestas, poblaciones y linajes. Cuando la incubación estaba a punto de terminar, los recién nacidos eran buscados a diario, y se anotaba la duración de la incubación. Los juveniles recién eclosionados fueron pesados, medidos (LCC) e individualmente marcados mediante la amputación de al menos dos falanges. Todas las lagartijas fueron liberadas en su sitio de captura una vez que la manipulación de laboratorio hubo terminado.

Población	Altitud (m)	Latitud (° N)	T (° C)	P (mm)	CP1	LCC hembra (mm)	Tamaño de puesta	Residuos tamaño de puesta vs. LCC hembra	Peso del huevo (g)	Tiempo de incubación (días)	Peso juvenil (g)	LCC juvenil (mm)	Residuos LCC juvenil vs. peso huevo	Residuos peso juvenil vs. LCC juvenil
Abrucena (AB)	1070	37.12	16.04	173.1	-0.437	73.4 ± 6.3 (8)	5.8 ± 0.8 (5)	-0.006 ± 0.178 (5)	0.43 ± 0.04 (23)	56.3 ± 1.4 (23)	0.56 ± 0.05 (23)	30.1 ± 0.9 (23)	0.017 ± 0.023 (23)	0.021 ± 0.069 (23)
Aranjuez (A)	594	40.00	17.89	249.6	-0.726	67.2 ± 4.3 (6)	5.0 ± 0.0 (2)	0.162 ± 0.170 (2)	0.34 ± 0.02 (6)	58.7 ± 0.5 (6)	0.47 ± 0.04 (6)	28.4 ± 0.5 (6)	-0.004 ± 0.020 (6)	-0.014 ± 0.083 (6)
Cabañas de Tera (C)	780	42.01	14.30	275.9	0.624	81.3 ± 5.7 (9)	6.4 ± 1.6 (9)	-0.094 ± 0.095 (9)	0.42 ± 0.04 (48)	59.5 ± 1.3 (48)	0.58 ± 0.04 (48)	30.5 ± 0.8 (48)	0.032 ± 0.021 (48)	0.027 ± 0.062 (48)
Horcajada (H)	943	40.03	17.00	344.7	0.312	77.5 ± 7.6 (6)	7.4 ± 3.4 (5)	0.075 ± 0.214 (5)	0.38 ± 0.03 (25)	54.1 ± 1.2 (25)	0.45 ± 0.04 (25)	28.2 ± 0.6 (25)	-0.028 ± 0.027 (25)	-0.046 ± 0.077 (25)
Despeñaperros (D)	592	38.37	18.10	259.5	-1.001	72.6 ± 4.8 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
El Frasno (F)	740	41.42	15.86	256.5	0.118	81.8 ± 3.7 (8)	7.8 ± 1.4 (8)	0.084 ± 0.170 (8)	0.37 ± 0.06 (52)	56.4 ± 1.2 (52)	0.48 ± 0.05 (52)	29.2 ± 0.9 (52)	0.012 ± 0.03 (52)	-0.066 ± 0.087 (52)
Hoces del Cabriel (HC)	720	39.54	17.48	277.4	-0.438	72.7 ± 2.6 (10)	4.6 ± 0.5 (9)	-0.115 ± 0.084 (9)	0.42 ± 0.03 (30)	56.8 ± 1.4 (30)	0.54 ± 0.04 (30)	29.5 ± 0.7 (30)	-0.004 ± 0.028 (30)	0.036 ± 0.073 (30)
Lerma (L)	940	42.13	13.79	347.5	1.238	80.5 ± 4.8 (6)	8.2 ± 1.6 (5)	0.153 ± 0.052 (5)	0.42 ± 0.09 (31)	53.5 ± 1.3 (31)	0.51 ± 0.07 (31)	28.6 ± 1.0 (31)	-0.032 ± 0.03 (31)	0.038 ± 0.106 (31)
Morata (M)	660	37.59	18.35	217.9	-1.225	67.5 ± 3.1 (6)	5.3 ± 1.5 (3)	0.187 ± 0.414 (3)	0.34 ± 0.04 (11)	57.9 ± 1.5 (11)	0.46 ± 0.02 (11)	28.6 ± 1.0 (11)	0.001 ± 0.026 (11)	-0.061 ± 0.083 (11)
Navacerrada (N)	1230	40.72	12.96	513.0	2.190	77.8 ± 2.3 (6)	7.0 ± 1.0 (3)	0.070 ± 0.120 (3)	0.34 ± 0.02 (15)	58.8 ± 1.4 (15)	0.43 ± 0.02 (15)	27.4 ± 0.7 (15)	-0.044 ± 0.023 (15)	-0.014 ± 0.059 (15)
Pallarés (P)	600	38.06	19.10	331.6	-0.956	81.5 ± 3.7 (8)	7.7 ± 0.5 (6)	0.049 ± 0.124 (6)	0.41 ± 0.07 (39)	62.4 ± 1.7 (39)	0.53 ± 0.07 (39)	29.8 ± 1.1 (39)	0.012 ± 0.027 (39)	-0.012 ± 0.086 (39)
El Pardo (EP)	658	40.50	18.49	263.9	-0.599	75.8 ± 6.4 (6)	6.2 ± 1.1 (5)	0.008 ± 0.223 (5)	0.42 ± 0.06 (25)	61.7 ± 1.5 (25)	0.53 ± 0.06 (25)	29.2 ± 1.1 (25)	-0.010 ± 0.027 (25)	0.035 ± 0.063 (25)
Sotos de Sepúlveda (S)	1042	41.32	14.11	397.0	1.379	78.4 ± 4.4 (5)	6.3 ± 0.5 (4)	-0.007 ± 0.096 (4)	0.40 ± 0.03 (17)	57.3 ± 1.6 (17)	0.5 ± 0.03 (17)	28.2 ± 0.5 (17)	-0.038 ± 0.017 (17)	0.051 ± 0.060 (17)
Valdepeñas (V)	722	38.90	18.08	256.9	-0.723	73.0 ± 4.3 (7)	4.3 ± 0.6 (3)	-0.167 ± 0.097 (3)	0.41 ± 0.06 (8)	62.4 ± 2.1 (8)	0.52 ± 0.07 (8)	29.8 ± 1.0 (8)	0.015 ± 0.023 (8)	-0.036 ± 0.118 (8)
Villuercas (VI)	960	39.46	16.60	325.3	0.243	77.0 ± 4.8 (10)	5.9 ± 2.2 (9)	-0.089 ± 0.287 (9)	0.41 ± 0.05 (42)	60.7 ± 1.3 (42)	0.54 ± 0.07 (42)	29.6 ± 1.5 (42)	0.006 ± 0.038 (42)	0.012 ± 0.071 (42)

Tabla 3.1. Altitud, latitud, temperatura media entre marzo y octubre (T), precipitación total entre marzo y octubre (P), y características reproductivas de las hembras (media ± desviación típica, con el tamaño muestral entre paréntesis) para las quince poblaciones estudiadas.

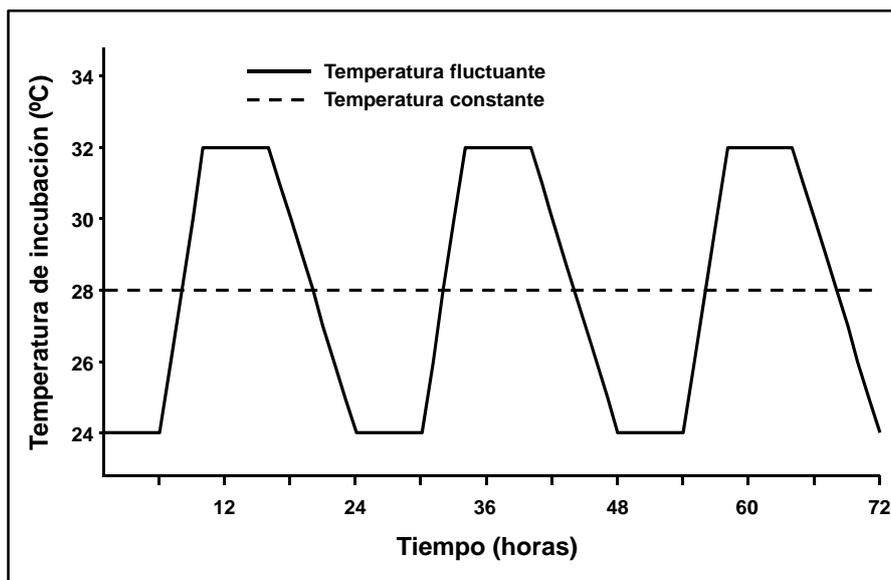


Figura 3.2. Temperatura en función de la hora diaria en los dos regímenes (de temperatura constante y temperatura variable) usados en este estudio según un diseño de puestas divididas (la mitad de los huevos de cada puesta a temperatura constante y la otra mitad a temperatura variable).

Análisis estadísticos

Todas las variables medidas (tiempo de incubación, peso del huevo, tamaño de la puesta, LCC y peso corporal de las hembras y los juveniles) fueron transformadas logarítmicamente para cumplir con los requisitos de los test paramétricos. La condición física de los juveniles fue estimada utilizando los residuos de la regresión del logaritmo del peso corporal sobre el logaritmo de la LCC al eclosionar. De forma similar, calculamos el tamaño de puesta relativo para las hembras (es decir, el tamaño de la puesta ajustado por la LCC de la hembra) usando los residuos de la regresión del logaritmo del tamaño de puesta sobre el logaritmo de la LCC.

A menos que se indique de otra manera, los datos fueron analizados usando modelos generales lineales. Para repartir la variación en rasgos fenotípicos entre las diferentes fuentes de variación (es decir, linaje, población y puesta) empleamos análisis de la varianza encajados. Este procedimiento, que fue la primera aproximación estadística para los estudios comparativos interespecíficos (Harvey y Mace 1982), fue el elegido aquí porque otros métodos más convencionales como los contrastes independientes (Felsenstein 1985a) o la autocorrelación filogenética (Cheverud et al. 1985) requieren que las unidades sujeto de análisis tengan una historia filogenética que represente las relaciones jerárquicas de descendencia y parentesco, y este supuesto

puede no cumplirse cuando hay flujo génico sustancial entre las unidades, como puede ser el caso en los análisis intraespecíficos. Más aún, nuestros datos genéticos nos permiten obtener una filogenia para haplotipos de ADN mitocondrial (Verdú-Ricoy et al. 2010) pero no de poblaciones (que pueden contener varios haplotipos más o menos diferenciados). De este modo, empleamos ANOVAs encajados apoyándonos en dos supuestos: (1) hubo una división antigua (aproximadamente hace 3.6 Ma) entre los clados oriental y occidental que han mantenido su identidad genética desde ese momento (Carranza et al. 2006, Verdú-Ricoy et al. 2010); y (2) el flujo génico es por definición más probable dentro de las poblaciones que entre ellas. Para evaluar los efectos de la temperatura de incubación usamos análisis de la varianza de medidas repetidas, utilizando la puesta como unidad muestral. Para cada puesta, comparamos el valor medio de los juveniles incubados a una temperatura constante de 28 °C con los de los juveniles incubados bajo un régimen de temperatura fluctuante. Para evitar trabajar con tamaños de muestra demasiado pequeños, mezclamos los datos de ambos tratamientos de temperatura a la hora de analizar los efectos de la puesta, la población y el linaje sobre los rasgos de los juveniles. Esto convierte nuestros análisis en conservadores, ya que los efectos potenciales de temperaturas constantes frente a fluctuantes están confundidos en el término error. Las variables geográficas y meteorológicas fueron reducidas a un único factor usando un Análisis de Componentes Principales (ACP). No se obtuvieron huevos viables de la única puesta realizada por hembras de Despeñaperros. Como consecuencia, esta población fue omitida en todos los análisis concernientes a variables reproductivas. De forma similar excluimos Villuercas, la población con ambos tipo de haplotipos de ADN mitocondrial, de todos los análisis en los que se utiliza el linaje usado como factor de clasificación.

Resultados

Los ANOVAs anidados (Tabla 3.2) con los datos mostrados en la Tabla 3.1 revelaron diferencias significativas entre hembras, anidadas en poblaciones, para todos los rasgo examinados en los propágulos (tiempo de incubación, peso del huevo, LCC al eclosionar, condición corporal –peso ajustado por LCC- de los juveniles, LCC de los juveniles ajustada por el peso del huevo). También hubo variación significativa entre poblaciones, anidadas en linajes, para todos los rasgos de los propágulos a excepción

del peso del huevo (para el cual la única fuente de variación importante fue entre las hembras de una determinada población). De forma similar, los rasgos de las hembras (LCC, tamaño de puesta, y tamaño de puesta ajustado por la LCC) diferían significativamente entre poblaciones de un determinado linaje. Sin embargo, los efectos de linaje solamente fueron significativos para el tiempo de incubación, explicando el 45% del total de la varianza entre sitios (Tabla 3.2). Las diferencias de tamaño de puesta entre las poblaciones fueron en gran medida, aunque no exclusivamente, atribuibles a diferencias en el tamaño corporal de las hembras (ANCOVA: efecto de población: $F_{12,53} = 1.99$, $P = 0.044$; LCC de hembra: $F_{1,53} = 38.33$, $P < 0.001$; comparar con el efecto de población mostrado en la Tabla 3.2).

	F	g.l.	P	% var
Peso del huevo				
Linaje	0.85	1, 11	0.375	1.66
Población	1.52	11, 54	0.151	21.39
Hembra	42.78	54, 263	< 0.001	69.08
Periodo de incubación				
Linaje	14.09	1, 11	0.003	45.37
Población	24.62	11, 54	< 0.001	35.43
Hembra	2.84	54, 263	< 0.001	7.06
LCC al eclosionar				
Linaje	0.58	1, 11	0.462	2.41
Población	8.19	11, 54	< 0.001	45.67
Hembra	5.44	54, 263	< 0.001	27.39
Residuo LCC juvenil - peso del huevo				
Linaje	0.26	1, 11	0.623	1.05
Población	11.33	11, 54	< 0.001	45.32
Hembra	2.81	54, 263	< 0.001	19.63
Residuo Peso - LCC de los juveniles				
Linaje	1.94	1, 11	0.191	3.19
Población	2.11	11, 54	0.035	18.05
Hembra	5.55	54, 263	< 0.001	41.94
LCC de la hembra				
Linaje	3.07	1, 11	0.108	11.71
Población	4.45	11, 54	< 0.001	41.97
Tamaño de puesta				
Linaje	0.87	1, 11	0.371	3.91
Población	5.19	11, 54	< 0.001	49.4
Fecundidad relativa (residuo Tamaño de puesta - LCC)				
Linaje	0.31	1, 11	0.589	0.91
Población	2.39	11, 54	0.017	32.44

Tabla 3.2. ANOVAs encajados para los rasgos de propágulos y hembras. Para los propágulos, las fuentes de variación son hembra anidada en población, población anidada en linaje, y linaje mitocondrial (oriental frente a occidental). Para las hembras, las fuentes de variación son población anidada en linaje y linaje.

Los análisis biogeográficos utilizando como datos las medias poblacionales arrojaron algunos resultados interesantes. Todas las variables geográficas y meteorológicas se combinaron en un único Componente Principal (CP1; véase la Tabla 3.3) que podría ser interpretado como un gradiente bioclimático de productividad en la región mediterránea de la Península Ibérica, otorgando puntuaciones mayores a las localidades situadas a mayor latitud o elevación, con mayores niveles de precipitación y menor temperatura durante el periodo de actividad de las lagartijas. Estos valores estuvieron negativamente correlacionados con los residuos de la LCC al eclosionar sobre el peso del huevo ($r = -0.639$, $n = 14$, $P = 0.014$), indicando que para un tamaño de huevo dado, los recién eclosionados son de mayor tamaño en los sitios más cálidos y secos. El tamaño corporal de las hembras era mayor en los sitios más fríos, húmedos y presumiblemente más productivos (correlación entre las puntuaciones de las localidades sobre el componente principal CP1 y la LCC media de las hembras: $r = 0.566$, $n = 15$, $P = 0.028$). En promedio, las localidades del linaje oriental eran más áridas que las del linaje occidental (media \pm desviación estándar de los niveles de precipitación entre marzo y octubre; linaje oriental: 264.8 ± 55.2 mm; linaje occidental: 356.3 ± 102.2 mm; $F_{1,12} = 4.88$, $P = 0.047$), y las hembras del linaje occidental eran un poco más grandes que las del linaje oriental (linaje oriental: 74.0 ± 5.1 mm; linaje occidental: 79.0 ± 2.4 mm; $F_{1,12} = 4.11$, $P = 0.065$). Como era de esperar, los tamaños de puesta fueron mayores para aquellas poblaciones con hembras más grandes (correlación entre el tamaño medio de la puesta y la LCC de la hembra: $r = 0.792$, $n = 14$, $P = 0.001$), y el compromiso entre tamaño de puesta y tamaño del juvenil se hizo evidente al nivel de población: el peso del huevo, el peso del juvenil y su LCC al eclosionar estuvieron correlacionados negativamente con los residuos del tamaño medio de puesta sobre la LCC de la hembras (todas las $r < -0.6$ y todas las $P < 0.02$). Finalmente, el tiempo de incubación (Figura 3.3) fue el rasgo reproductivo mejor predicho por la combinación de factores históricos (linaje de ADN mitocondrial) y ecológicos (CP1). Para cada linaje, la duración de la incubación decreció a medida que la puntuación sobre CP1 aumentaba (es decir, la incubación fue más corta en sitios más fríos y productivos; ANCOVA: $F_{1,10} = 12.27$, $P = 0.0057$), y para un clima, resultó más corta para las poblaciones del linaje oriental que para las del linaje occidental (ANCOVA: $F_{1,10} = 15.91$, $P = 0.0026$; véase la Figura 3.3). Juntas, estas dos variables explicaron el 67.3% de la varianza en los tiempos medios de incubación ($F_{2,10} = 10.3$, $P = 0.004$). El régimen de incubación no tuvo efectos sobre la LCC, el peso ni la condición de los juveniles (todas las $P > 0.14$),

pero sí que afectó al tiempo de incubación. Para cada puesta, la duración de la incubación fue más corta bajo un régimen de temperatura fija que bajo un régimen de temperatura fluctuante (ANOVA de medidas repetidas dentro de puestas con los datos mostrados en la Figura 3.4: $F_{1,65} = 62.06$, $P < 0.001$), y dicha diferencia fue levemente mayor, juntando todos los datos de un linaje dado, para las puestas occidentales que para las orientales (interacción de régimen de temperatura x linaje: $F_{1,65} = 4.84$, $P = 0.031$).

CPI	
Latitud	0.712
Altitud	0.819
Temperatura	-0.937
Precipitación	0.807
Autovalor	2.707
Varianza	0.677

Tabla 3.3. Análisis de Componentes Principales con las variables climáticas reflejadas en la Tabla 3.1, mostrando los factores de carga (todas las $P < 0.003$), el autovalor y el porcentaje de varianza explicada para el primer componente obtenido.

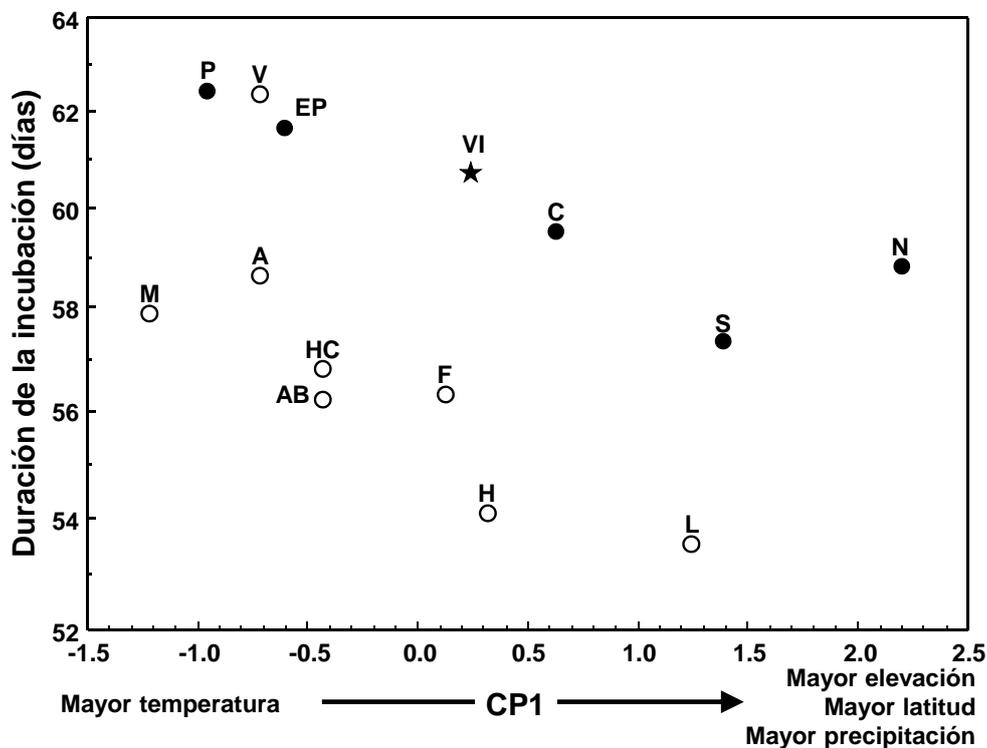


Figura 3.3. Duración del tiempo de incubación en función de (1) un gradiente climático que otorga valores elevados a sitios con temperaturas más bajas y niveles más bajos de precipitación, elevación y/o latitud (véase la Tabla 3.1); y (2) linaje de ADN mitocondrial. Véase la Figura 3.1 para los símbolos de las poblaciones y los linajes.

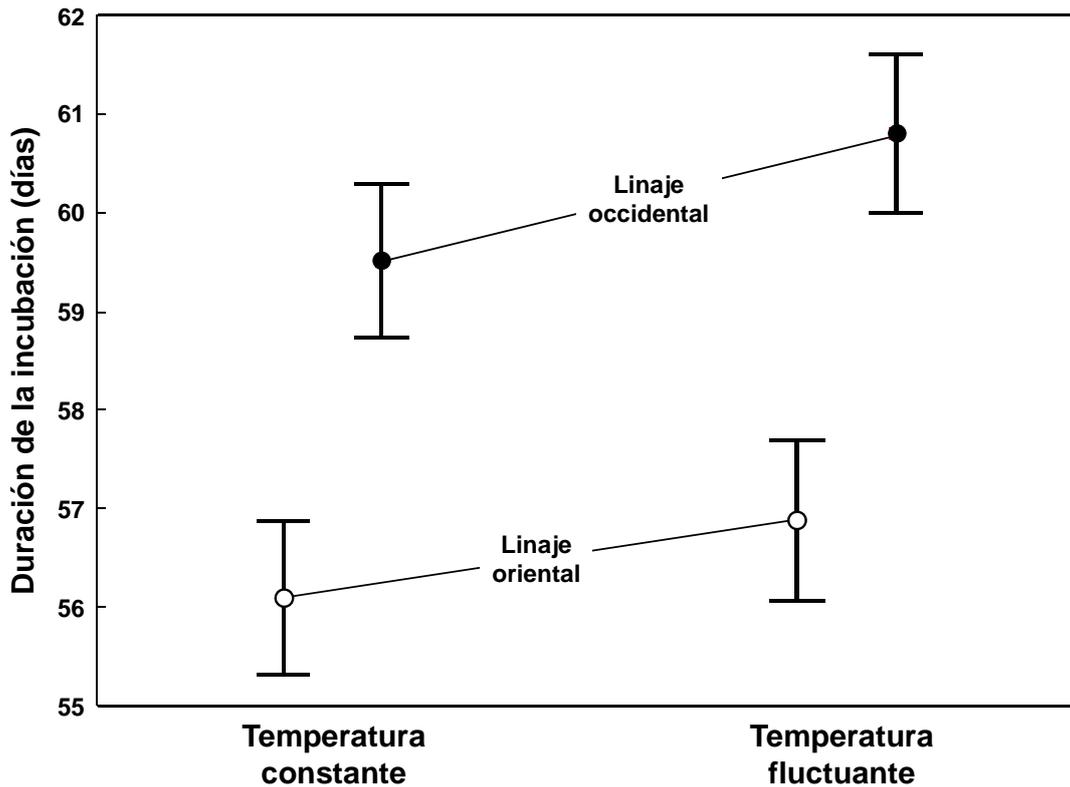


Figura 3.4. Duración de la incubación (media \pm intervalo de confianza al 95%) en función del régimen de incubación (régimen constante vs. fluctuante) y del linaje mitocondrial.

Discusión

Nuestros datos muestran una variación intraespecífica sustancial en todos los caracteres reproductivos examinados (tamaño de la hembra, tamaño de la puesta, fecundidad relativa, peso medio del huevo, LCC al eclosionar, condición física de los juveniles y tiempo de incubación) en todos los niveles jerárquicos considerados. En este apartado, discutimos las implicaciones de nuestros resultados para las hipótesis presentadas en la Introducción, con especial referencia a la importancia relativa del linaje, la población y la puesta como fuentes de variación de los rasgos reproductivos, y dentro del contexto de algunas de las presiones selectivas que son características de los ambientes mediterráneos.

En relación a nuestra primera hipótesis, las diferencias interpoblacionales, que ya han sido documentadas antes para caracteres reproductivos tanto de lacértidos (Du et al. 2005a, Iraeta et al. 2006, Díaz et al. 2007, Wang et al. 2011) como de otras familias

de lagartos (Sears y Angilletta 2003, Radder 2006, Du et al. 2010a), fueron la fuente de variación principal para el tamaño de puesta y la fecundidad relativa. Conviene destacar que las diferencias interpoblacionales fueron también importantes para la LCC de las hembras, con un 54% de varianza explicada; de esta cifra, aproximadamente el 12% es atribuible a diferencias entre los linajes oriental y occidental, mientras que el 42% restante se asocia a diferencias entre las poblaciones de un mismo linaje. Este patrón de variación estuvo causado muy probablemente por las diferencias ambientales en productividad, ya que el tamaño medio de la hembra estuvo positivamente correlacionado con las puntuaciones de las localidades en un gradiente que va de menos a más precipitación y de más a menos en temperatura, y las poblaciones del linaje occidental presentaron tanto hembras más grandes como valores de precipitación más elevados que las poblaciones del linaje oriental. Un estudio reciente ha demostrado que en los lagartos de la familia Tropicuridae el tamaño corporal de las hembras se relaciona con un componente climático de precipitación, que es probablemente un correlato de la producción primaria; puesto que el tamaño de la puesta depende del tamaño de la hembra, la productividad parece ejercer un efecto indirecto sobre el tamaño de la puesta (Brandt y Navas 2011). De forma similar, nuestros datos muestran que el tamaño medio de la puesta depende principalmente, aunque no sólo, de la LCC de la hembra, sugiriendo tanto un efecto próximo de las condiciones locales que influirían sobre la LCC materna como un papel relativamente menor de las diferencias intrínsecas, quizás genéticas, entre poblaciones. Un experimento previo de trasplante recíproco (Iraeta et al. 2006) entre dos poblaciones del linaje occidental incluidas en este estudio (El Pardo y Navacerrada) demostró que el tamaño y la tasa de crecimiento de los juveniles estaban influenciadas por la localidad de origen de la madre, lo que significa que las diferencias de las poblaciones pueden reflejar una diferenciación genética (Du et al. 2005a, Iraeta et al. 2006, Buckley et al. 2010). Sin embargo, estos rasgos estaban determinados en primera instancia por el entorno del crecimiento, puesto que la localidad de montaña (que producía fenotipos de crecimiento más lento) proporcionaba más comida y permitía a los juveniles crecer más rápido y alcanzar tamaños mayores (Iraeta et al. 2006). Si estos efectos persisten en el tiempo, pueden generar diferencias en la LCC materna y en el tamaño de puesta entre poblaciones como las reflejadas en nuestro estudio (pero véase Buckley et al. 2007), dando lugar a patrones paradigmáticos de variación contragradiante en la evolución de las estrategias reproductivas (Iraeta et al. 2013).

El tamaño del juvenil, que varió de forma significativa entre poblaciones y hembras pero no entre linajes (Tabla 3.2), fue mayor en las localidades más secas y cálidas, confirmando así nuestra segunda hipótesis. Estudios previos con ésta y otras especies de lagartos han encontrado patrones similares de juveniles mayores en sitios más cálidos, más secos o situados a menor latitud o altitud (Sinervo 1990, Iraeta et al. 2006, Díaz et al. 2007). Sin embargo, el patrón opuesto de juveniles más grandes a mayor altitud o latitud también ha sido descrito (Oufiero y Angilletta 2006, Niewiarowski y Angilletta 2008, Du et al. 2010a, b), indicando una ventaja para las crías más grandes en ambientes más fríos debido a limitaciones térmicas que afectarían a las oportunidades para encontrar, ingerir y asimilar el alimento (Adolph y Porter 1996, Sears y Angilletta 2003). No obstante, nuestros datos sugieren una explicación alternativa que puede ser importante para comprender las estrategias vitales de las lagartijas en ambientes mediterráneos, en los que las escasas precipitaciones durante el verano y las limitaciones tróficas asociadas pueden seleccionar bajos niveles de actividad, limitar las tasas de crecimiento de los juveniles, e incrementar así la ventaja para la supervivencia de los juveniles de mayor tamaño bajo condiciones de falta de alimento y/o en años con sequía (Ferguson y Fox 1984, Sinervo y DeNardo 1996, Sears y Angilletta 2003, Iraeta et al. 2006, 2008). Esto es consistente con la hipótesis de que la producción de propágulos relativamente grandes es una respuesta adaptativa a la baja disponibilidad de alimento (Lack 1954) o, más generalmente, que un cambio hacia propágulos mayores mejorará la eficacia biológica parental en ambientes donde las condiciones para el crecimiento y/o la supervivencia de los juveniles son pobres (Roff 1992, Johnston y Leggett 2002). Tal patrón puede tener dos explicaciones, ambas consistentes con nuestros datos. La primera es la diferenciación de las poblaciones, con diferencias genéticas favoreciendo un mayor tamaño de las crías en hábitats pobres, y la segunda es una respuesta plástica adaptativa por parte de las hembras, ya sea directa o a través de efectos maternos (Bernardo 1996, Johnston y Leggett 2002).

Por otro lado, nuestra segunda hipótesis falló en su predicción de que el peso del huevo y la condición corporal de las crías (es decir, el peso corporal ajustado por la LCC) debían diferir entre poblaciones, ya que éstos fueron los únicos rasgos de los propágulos para los cuales los efectos de la población fueron no significativos o muy pequeños. En cambio, estos rasgos se vieron afectados principalmente por las diferencias entre puestas de una determinada población (es decir, efectos familiares),

quizás debido a los efectos intercorrelacionados del tamaño de la hembra, el tamaño de la puesta y el parentesco entre hermanos o semihermanos. En cualquier caso, la gran cantidad de varianza entre puestas (relativa a la varianza error) condujo a los efectos familiares a tener prioridad sobre las restantes fuentes de variación para estos rasgos.

En relación a nuestra tercera hipótesis, solo obtuvimos un apoyo parcial para la misma, ya que la correlación entre el tiempo de incubación y la temperatura ambiente fue altamente significativa solo tras controlar por los efectos del linaje. De hecho, el tiempo de incubación fue la única característica reproductiva para la cual todas las fuentes de variación fueron importantes, incluyendo la divergencia entre los linajes oriental y occidental (Tabla 3.2: aproximadamente el 45% del total de la varianza vino explicado por ese efecto). De esta manera, nuestros datos muestran que el efecto de la diferencia entre estos antiguos linajes, que debieron separarse después de la apertura del Estrecho de Gibraltar (Carranza et al. 2006), se imponen sobre los jerárquicamente inferiores efectos de población y hembra (35 y 7% de varianza explicada, respectivamente). Para cada linaje, las diferencias interpoblacionales estuvieron principalmente relacionadas con influencias climáticas, porque a idénticas temperaturas en el laboratorio, los periodos de incubación fueron más cortos para las lagartijas de sitios más fríos y húmedos. De esta manera, el patrón observado revela variación contragradiante, porque en el laboratorio el periodo de incubación aumenta a medida que la temperatura de incubación decrece (Iraeta et al. 2006, 2007). Resultados similares se han descrito previamente para poblaciones de *Sceloporus undulatus* que experimentan diferentes temperaturas ambientales por vivir a diferentes latitudes o altitudes (Oufiero y Angilletta 2006, Niewiarowski y Angilletta 2008, Du et al. 2010a). Sin embargo, es importante apuntar que la variación contragradiante se manifiesta en nuestros datos solo después de controlar por los efectos de linaje, lo que sugiere con fuerza que ha evolucionado independientemente en ambos linajes. Si estos patrones paralelos en las respuestas de las poblaciones tienen una base genética, pueden haber sido moldeados por presiones selectivas que favorezcan periodos de incubación más cortos para compensar el crecimiento embrionario relativamente más lento en ambientes más fríos (Oufiero y Angilletta 2006); además, la mayor disponibilidad de alimento produciría un crecimiento post-natal más rápido en tales ambientes, y esto podría tener más peso que los costes de eclosionar antes o con un tamaño menor (Iraeta et al. 2006). La razón por la que los huevos orientales eclosionan antes que los occidentales sigue

siendo desconocida, aunque podría estar relacionada con las diferencias en la disponibilidad de agua para las crías en desarrollo, dado que la precipitación fue la única variable ambiental que difería de forma significativa entre el linaje occidental (más húmedo) y el oriental (más seco). Por último, merece la pena mencionar que los huevos incubados a una temperatura constante de 28 °C eclosionaron antes de lo que lo hicieron sus hermanos incubados a temperaturas fluctuantes de 28 ± 4 °C, particularmente en el caso de las puestas de las hembras de poblaciones occidentales (Figura 3.4). Esto resulta sorprendente porque estudios previos han mostrado que para una media térmica determinada, la incubación se acorta a medida que la varianza se incrementa en el escíncido de ambientes alpinos *Bassiana duperreyi* (Shine y Harlow 1996, Du y Shine 2010). Estos autores argumentan que en dicha especie existe una relación exponencial entre la tasa de desarrollo y la temperatura, lo que implica que un determinado incremento térmico ejerce un efecto mayor en el desarrollo que una reducción térmica de la misma magnitud. Aunque no poseemos datos, podemos especular que el patrón opuesto podría ocurrir en *P. algirus*, una especie mediterránea en la que las hembras seleccionan sitios para la puesta con una temperatura media ≥ 26 °C y con una menor varianza que la disponible al azar (Iraeta et al. 2007). Por lo tanto, si la tasa de desarrollo se incrementa a una velocidad menor por encima de la temperatura media de incubación de lo que decrece por debajo de la misma, entonces el efecto neto de incrementar la varianza térmica será retrasar el desarrollo. Nuestros resultados, por tanto, indican la necesidad de llevar a cabo estudios para determinar la dependencia térmica de la embriogénesis (absorción de la yema, tasa metabólica, ritmo cardíaco, etc; Storm y Angilletta 2007, Oufiero y Angilletta 2010, Du y Shine 2010) bajo temperaturas de incubación constantes y fluctuantes en ésta y otras especies de lagartos de climas mediterráneos cálidos y secos.

IV. Capítulo 4

Respuestas fenotípicas a las condiciones de incubación en *Psammodromus algirus*: un experimento con poblaciones ecológicamente diferenciadas de dos linajes filogeográficos

Este Capítulo reproduce íntegramente el siguiente manuscrito:

Joaquín Verdú-Ricoy, J., Iraeta, P., Salvador, A., Díaz, J.A. Phenotypic responses to incubation conditions in ecologically distinct populations of the lizard *Psammodromus algirus*: a tale of two phylogeographic lineages. Enviado a *Biological Journal of the Linnean Society*.

Respuestas fenotípicas a las condiciones de incubación en *Psammodromus algirus*: un experimento con poblaciones ecológicamente diferenciadas de dos linajes filogeográficos

Resumen. La escasa capacidad de dispersión y la condición ectotérmica de los reptiles escamosos (Reptilia: Squamata) ha generado patrones complejos de estructura filogeográfica que pueden añadir un componente de “inercia (filo)genética” en la sensibilidad térmica o hídrica de sus embriones. En este estudio presentamos los resultados de un experimento con cuatro poblaciones del lacértido *Psammodromus algirus* en las que evaluamos los efectos de la temperatura de incubación (24 vs. 32 °C), el contenido en agua del sustrato de incubación (10 vs. 80%), el linaje filogeográfico (oriental vs. occidental) y la población de origen (con localidades a más o menos altitud en cada uno de los dos linajes) sobre diversos rasgos fenotípicos de los huevos y los juveniles. Las hembras occidentales fueron más grandes y realizaron puestas mayores y más pesadas que las orientales. El tiempo de incubación fue mucho mayor a baja temperatura, se incrementó ligeramente con la humedad y fue más corto para las hembras de las localidades de mayor altitud que para las de llanura. Los huevos incubados a 24 °C produjeron juveniles más largos y pesados y con colas más cortas que los incubados a 32 °C. Los juveniles del linaje occidental y los incubados a 32 °C sobrevivieron mejor hasta los 30 días que los juveniles orientales y los incubados a 24 °C; la menor tasa de supervivencia (58%) correspondió a los juveniles de la población oriental de llanura incubados a 24 °C. Puesto que los juveniles incubados a 32 °C crecieron más rápido, a la edad de 30 días habían compensado su desventaja inicial de tamaño, y a la edad de 37-47 días ya eran mayores que los incubados a 24 °C. El número de *sprints* por carrera fue menor para los juveniles orientales que para los occidentales, que recorrieron distancias totales más largas que los orientales. Así, nuestros resultados indican que aunque la temperatura de incubación fue la principal fuente de variación fenotípica, no todos sus efectos fueron evidentes en el momento de la eclosión. Esto es así porque los juveniles incubados a altas temperaturas eclosionaron más pequeños, pero sobrevivieron mejor y crecieron mucho más rápido durante el primer mes de vida. Además, también detectamos diferencias entre los linajes en la sensibilidad térmica de los embriones, con un grupo occidental más tolerante a la incubación a bajas temperaturas. Puesto que el linaje oriental ocupa áreas más cálidas y secas que el occidental, sugerimos que tales diferencias pueden haber limitado la expansión del linaje oriental en el borde occidental de su área de distribución.

Introducción

Los reptiles escamosos representan sistemas modelo excelentes para el estudio de la evolución de las estrategias vitales, ya que las dos principales consecuencias de la ectotermia terrestre, los bajos requerimientos energéticos y la termorregulación comportamental, han tenido consecuencias evolutivas importantes (Shine 2005). Por ejemplo, las hembras reproductivas pueden manipular las temperaturas de incubación, bien seleccionando sitios apropiados para la puesta (Shine y Harlow 1996, Iraeta et al. 2007) o bien reteniendo los huevos en desarrollo en el oviducto, lo que acorta los tiempos de incubación y puede conducir a la evolución del viviparismo. Además, la libertad respecto de las restricciones que la conservación del calor corporal impone al tamaño de los endotermos permite a los reptiles producir propágulos pequeños en grandes cantidades (Shine 2005). Esto promueve un ajuste dinámico de las estrategias vitales (*life-histories*) a los ambientes locales, que puede ser el resultado de efectos próximos (como las temperaturas disponibles o la abundancia de alimento) o de adaptación a regímenes selectivos geográficamente variables (Sinervo y Adolph 1989, Adolph y Porter 1993, Iraeta et al. 2006). Esta flexibilidad ha generado una enorme cantidad de variación intraespecífica, lo que ha conllevado un incremento en el número de estudios enfocados en el nivel de la población (Niewiarowski et al. 2004, Díaz et al. 2012; véase el Capítulo 3).

Además, la escasa capacidad de dispersión de los reptiles, combinada con su condición ectotérmica, es probablemente la responsable de las comúnmente complejas estructuras filogeográficas de sus poblaciones, especialmente en áreas conocidas por haber servido como refugios durante los avances glaciares del Pleistoceno, durante los cuales la distribución de la herpetofauna se ha visto probablemente limitada a las zonas costeras y/o de menor altura de las penínsulas meridionales del continente europeo (Gómez y Lunt 2007). Esto debería añadir un componente de “inercia (filo)genética” (Hewitt 2000) a las estrategias vitales de los escamosos y a la plasticidad de sus estrategias reproductivas en respuesta a la variación ambiental en factores clave como la temperatura o el contenido en agua del suelo.

Puesto que los eventos tempranos en el desarrollo individual pueden tener más impacto que los tardíos en el fenotipo adulto (Qualls y Shine 1998), los efectos ambientales se suponen especialmente importantes cuando actúan sobre el desarrollo

embrionario. Así, el papel de factores ambientales como la temperatura o la humedad (Deeming y Ferguson 1991, Ji y Braña 1999) en la modulación de la variación fenotípica parece mayor cuando una gran parte del desarrollo ocurre fuera del cuerpo materno, como ocurre en las especies ovíparas (Elphick y Shine 1998). Es bien sabido que la temperatura es un condicionante fundamental de la velocidad de las reacciones metabólicas propias del desarrollo embrionario (Qualls y Shine 1998), y que por tanto determina en buena medida la duración de la incubación (Shine y Harlow 1996, Oufiero y Angilletta 2006, Parker y Andrews 2007, Monasterio et al. 2011), y también que los sustratos húmedos permiten a los huevos de cáscara fina de los reptiles incrementar su masa y volumen durante la incubación por medio de la absorción de agua (Packard 1991, Ji y Du 2001). Como consecuencia, los efectos térmicos e hídricos han sido ampliamente estudiados en los lagartos y serpientes (Deeming 2004), en los que la tasa de desarrollo (Sinervo y Adolph 1994), el éxito de eclosión (Van Damme et al. 1992, Angilletta et al. 2000), y el tamaño, forma (Shine et al. 1997, Elphick y Shine 1998, Qualls y Shine 2000), sexo (Bull 1980, Janzen y Paukstis 1991), capacidad locomotora y comportamiento (Van Damme et al. 1992) de los juveniles eclosionados, se ven fuertemente influidos por las condiciones de incubación. Es más, en algunos casos la variación en la temperatura y humedad produce efectos a largo plazo que persisten a lo largo del desarrollo postnatal y pueden afectar a la eficacia biológica (Elphick y Shine 1998).

Sin embargo, y como cabría esperar, las respuestas de los lagartos a las condiciones de incubación son extremadamente diversas. Aunque las temperaturas altas generalmente reducen los tiempos de incubación, su impacto sobre el éxito de eclosión es mucho menos predecible; dependiendo de la especie, la incubación en ambientes cálidos puede incrementar (Telemeco et al. 2010), no afectar (Parker y Andrews 2007), o más comúnmente presentar efectos deletéreos sobre el éxito de eclosión (Ji y Braña 1999, Angilletta et al. 2000). Otros rasgos que también pueden exhibir respuestas diferentes a la temperatura dependiendo de las especies son el tamaño del juvenil (Shine y Harlow 1996, Elphick y Shine 1998, Telemeco et al. 2010, Rodríguez-Díaz et al. 2010) y la capacidad locomotora (Elphick y Shine 1998, Qualls y Shine 1998, Braña y Ji 2000). Es interesante señalar que también se han documentado respuestas variables a las condiciones de incubación a nivel intraespecífico, habiéndose detectado diferencias entre las poblaciones de una misma especie en la dependencia térmica del éxito de

eclosión (Niewiarowski y Angilletta 2008), el periodo de incubación (Qualls y Shine 1998, Du et al. 2010a), el tamaño del juvenil (Sears y Angilletta 2003, Caley y Schwarzkopf 2004, Buckley et al. 2010, Du et al. 2010a, b) o la tasa de crecimiento (Oufiero y Angilletta 2006, Niewiarowski y Angilletta 2008). Así, los estudios intraespecíficos ofrecen una excelente oportunidad para evaluar el ajuste causal y funcional entre la variación fenotípica y los factores ambientales, particularmente cuando las poblaciones de una especie se distribuyen a lo largo de gradientes ambientales y exhiben algún grado de divergencia genética como resultado de eventos pasados de diferenciación (Avise et al. 1998, Díaz et al. 2012).

En este contexto hemos diseñado un experimento con una especie ibérica común y ampliamente distribuida de reptil escamoso, el lacértido *Psammodromus algirus*, para evaluar los efectos del ambiente de incubación (variación en la temperatura y humedad), del linaje filogeográfico (oriental vs. occidental, véase más abajo) y de la población de origen (con dos réplicas por linajes, una población más de llanura y otra de mayor altitud, con las diferencias de clima y productividad que esto implica) sobre diversos rasgos fenotípicos de los huevos y juveniles que pueden estar relacionados con la eficacia biológica de los individuos. Con este propósito, capturamos hembras grávidas de cuatro poblaciones diferentes y las mantuvimos en un ambiente común hasta que realizaron las puestas. Los huevos fueron asignados aleatoriamente a uno de los cuatro tratamientos de temperatura y humedad (temperatura alta vs. baja x humedad alta vs. baja) usando un diseño de puestas divididas, y medimos los rasgos fenotípicos en el momento de la eclosión (tiempo de incubación, morfología del juvenil, éxito de eclosión), tras un mes de desarrollo postnatal (morfología del juvenil, tasas de crecimiento, supervivencia) y unos pocos días después (capacidad locomotora). Para situar nuestro experimento en su apropiado contexto filogeográfico, es importante comentar que la Península Ibérica se caracteriza a escala global por presentar un gradiente climático de temperatura y precipitación que la atraviesa en dirección NO-SE, con áreas más húmedas y templadas en el noroeste, y áreas más cálidas y secas en el sureste (Ninyerola et al. 2005). Además, estudios anteriores sobre esta especie han revelado una antigua estructura filogeográfica, con dos linajes de ADN mitocondrial que corresponden a las áreas occidentales y orientales de la Península Ibérica (Carranza et al. 2006, Verdú-Ricoy et al. 2010, véanse los Capítulos 2 y 5).

Más concretamente, las preguntas específicas que nos planteamos son:

1. ¿Ejercen algún tipo de efecto los niveles de temperatura y humedad durante el desarrollo embrionario sobre el éxito de eclosión, el tamaño o la condición de los juveniles de *P. algirus*?
2. En caso afirmativo, ¿cuánto duran esos efectos? ¿Muestran las puestas de distintos linajes mitocondriales o de distintas poblaciones respuestas diferentes a las condiciones de incubación? O, alternativamente, ¿podemos generalizar los efectos observados de los factores ambientales sobre la variación fenotípica a otras poblaciones de la misma especie?
3. ¿Cuál es la importancia relativa de estas fuentes de variación? ¿Hasta qué punto pueden ayudar a comprender la actual distribución de los linajes filogeográficos?

Material y métodos

Especie de estudio

Psammodromus algirus es un lacértido de mediano tamaño (longitud cabeza-cloaca [LCC] en el adulto: 60-90 mm; peso 6-16 g), heliotérmico e insectívoro, que vive en zonas de bosque y matorral de la Península Ibérica, la región costera suroriental de Francia y el Noroeste de África (Arnold 1987, Díaz y Carrascal 1991). El periodo de actividad se extiende desde marzo hasta octubre; El cortejo y las puestas ocurren entre abril y junio, y los juveniles eclosionan entre agosto y septiembre (Veiga y Salvador 2001). El tamaño de puesta comprende un rango de entre 3 y 12 huevos, y la frecuencia de puestas varía entre una y dos por año.

En base a las secuencias de genes de ADN mitocondrial, es evidente la estructura filogeográfica para esta especie (Carranza et al. 2006), que está formada por dos linajes divergentes, recíprocamente monofiléticos, uno oriental y otro occidental en la Península Ibérica, cuyas distribuciones están separadas por una estrecha zona de contacto a lo largo del centro de la Península (Verdú-Ricoy et al. 2010, Díaz et al. 2012, véanse los Capítulos 2 y 3).

Mantenimiento de los adultos

Las lagartijas adultas se capturaron en mayo de 2011 en cuatro localidades diferentes (Tabla 4.1): El Pardo, un sitio de llanura del linaje occidental; Navacerrada, una población montana del linaje occidental; Aranjuez, una localidad de llanura del linaje oriental, y Torrejoncillo, una población a elevada altitud del linaje oriental. Merece la pena comentar que nuestras cuatro poblaciones comprenden prácticamente todo el rango altitudinal de esta especie en el centro de España, que se sitúa entre 450 y 1.400 m sobre el nivel del mar.

Debido a que la detección de folículos ováricos desarrollados o de huevos oviductales por palpación del vientre no fue siempre posible, se capturaron tanto hembras como machos para asegurar el éxito reproductivo en el laboratorio. Todos los individuos se transportaron en el mismo día de captura al Departamento de Zoología (Universidad Complutense de Madrid) y se colocaron en terrarios de paredes blancas y opacas rellenos de tierra humedecida recubierta de hojarasca. Una bombilla de 60 W fue suspendida en un extremo del terrario para crear un gradiente fototérmico (entre 25-50 °C) que permitiera la termorregulación dentro del rango preferido de temperaturas (Díaz et al. 2006). También se dispuso luz UV. A las lagartijas se les alimentó con grillos (*Acheta domestica*) espolvoreados con una vitamina comercial y un suplemento de calcio. Todos los terrarios fueron provistos de alimento y agua *ad libitum*. Una vez en el laboratorio, se midió (LCC), pesó y marcó individualmente (mediante la amputación de una o dos falanges) a todas las lagartijas.

Mantenimiento de los huevos y juveniles

Las hembras grávidas fueron revisadas diariamente para detectar si habían puesto. Las puestas tuvieron lugar entre el 19 de mayo y el 1 de julio (una puesta por hembra, entre 3 y 9 huevos por puesta). Una vez detectados, los huevos de cada puesta eran cuidadosamente separados, contados y pesados (con una precisión de ± 1 mg). Cada uno de los huevos ($n = 198$) se colocó en un bote de plástico cerrado de 150 ml relleno de aproximadamente 35 g de vermiculita humedecida. Se asignó cada huevo a uno de los cuatro posibles tratamientos de un diseño factorial con dos niveles de temperatura y otros tantos niveles de humedad. Los tratamientos de humedad se establecieron añadiendo 1 ó 8 g de agua por cada 10 g de vermiculita (de aquí en adelante, 10% y 80% de humedad, respectivamente). Para establecer los tratamientos de

temperatura, los huevos se distribuyeron en dos incubadoras (Friocell, Königswinter, Germany) ajustadas a una temperatura constante de o bien 24 o bien 32 °C. Se trató de conseguir un diseño balanceado de puestas divididas (*split-clutch*) distribuyendo los huevos de una misma puesta de la forma más equitativa posible entre los tratamientos. De cualquier modo, y debido a que el tamaño de puesta fue casi siempre ≥ 4 (solo una de 33 puestas estuvo formada por solo 3 huevos), pudimos asignar al menos un huevo de cada puesta a cada uno de los cuatro tratamientos experimentales. Se ha propuesto que tanto la media como la varianza de la temperatura de incubación pueden influir sobre los rasgos de los juveniles (Shine y Harlow 1996, Du y Ji 2006), lo cual restringiría la extrapolación de los resultados de experimentos de incubación con temperatura constante a las condiciones que se dan en la naturaleza (Shine et al. 1997). Sin embargo, los regímenes térmicos constantes vs. fluctuantes no ejercen efectos significativos sobre los rasgos morfológicos de los juveniles de *P. algirus*, aunque pueden producir diferencias en los tiempos de incubación (Capítulo 3). Se seleccionaron temperaturas experimentales de 24 y 32 °C asumiendo que estos valores representan los extremos opuestos del rango térmico por debajo y por encima de la temperatura de incubación óptima descrita para *P. algirus* (es decir, 26-28 °C; Iraeta et al. 2007, Monasterio et al. 2011), con 24 °C actuando como un umbral crítico bajo el cual la reproducción se ve comprometida debido a una excesiva prolongación de la incubación (Monasterio et al. 2011).

Cuando la incubación estaba a punto de terminar, los recién nacidos eran buscados a diario. Una vez encontrados se pesaron (con una precisión de ± 1 mg), midieron (LCC y longitud de la cola, con una precisión de ± 1 mm) y se colocaron individualmente en cajas de plástico (225 mm longitud x 140 mm anchura x 150 mm altura) con bombillas de 60 W, lámparas UV y una teja para refugiarse. A todos los individuos se les concedieron las mismas oportunidades de alimentación (3 grillos pequeños por día) durante los 30 primeros días de vida. El agua se dispuso *ad libitum*. Para estimar las tasas de crecimiento postnatal, se midió a todos los individuos de nuevo a la edad de 30 días. También se estimó el alimento ingerido contando el número de grillos consumidos cada día y calculando el promedio para esos 30 días. Tras el periodo de un mes de suministro controlado de alimento, se transportaron a otra habitación donde pudieron alimentarse *ad libitum*, bajo condiciones naturales de iluminación y temperatura (es decir, sin ninguna fuente adicional de luz o calor).

Capacidad locomotora

La capacidad locomotora de los juveniles se midió aproximadamente 10 días después del final del periodo de crecimiento, es decir, a una edad de 40.4 ± 1.2 días (media \pm desviación típica, rango = 37-47). Antes de cada carrera, los juveniles experimentales se colocaron en una incubadora a 32° C durante 30 minutos, para evitar los efectos confundidores de las diferencias en la temperatura corporal. Tras ello, cada lagartija se liberó en una pista de carreras de 240 x 30 x 40 cm, con suelo acorchado para asegurar la tracción, dividida en secciones de 15 cm, y se la obligó a correr acercando la mano a las extremidades posteriores hasta que se encontraba exhausta y se negaba a seguir corriendo. Aunque la capacidad de carrera de cada juvenil fue evaluada una sola vez, la experiencia previa con esta especie indica que las medidas de la capacidad locomotora utilizando este tipo de protocolo producen niveles aceptables de repetibilidad (Pérez-Tris et al. 2004, Iraeta et al. 2010). Todas las carreras se grabaron con una cámara (Sony Handycam DCR-SR57E) a 25 fotogramas/s, y los vídeos resultantes fueron examinados para determinar el número de *sprints* durante la carrera y la velocidad y distancia recorrida en cada *sprint*. Se definió un *sprint* individual como cualquier desplazamiento entre dos paradas sucesivas en una carrera. Se descartaron los *sprints* extremadamente cortos (aquellos con una distancia recorrida < 15 cm) y los demasiado lentos (aquellos con ≥ 8 fotogramas para cubrir una sección de 15 cm). La velocidad se midió (en cm/s) contando el número de fotogramas empleados en recorrer cada distancia conocida y transformándolos en unidades de tiempo. Estimamos la velocidad media y la distancia media recorrida para cada carrera como los valores medios de todos sus *sprints*, y definimos la velocidad máxima y la distancia máxima de una carrera como la velocidad del *sprint* más rápido y la distancia recorrida en el *sprint* más largo, respectivamente. La distancia total de una carrera se estimó como la suma de todas las distancias recorridas. La LCC, la longitud de la cola y el peso corporal de los juveniles se midieron tras cada carrera. Al término de los experimentos, todos los adultos y juveniles fueron liberados en sus localidades de captura y en las de sus madres, respectivamente.

Análisis estadísticos

Las tasas de crecimiento, estimadas tanto para la LCC como para el peso corporal, se calcularon usando la expresión \ln (medida a los 30 días / medida en el

momento de la eclosión) / 30, en días⁻¹, que refleja el incremento proporcional diario en tamaño o peso (Sinervo 1990). Los análisis estadísticos se realizaron con los módulos de Análisis log-lineal y Modelos Generales Lineales (GLM) del paquete estadístico Statistica 7.0 (Statsoft, Inc. 2004), tras haber comprobado los requisitos de los tests paramétricos y, en su caso, haber transformado logarítmicamente las correspondientes variables. Para los análisis de los rasgos de las hembras (LCC, tamaño de puesta, peso de puesta, peso medio del huevo) empleamos el linaje mitocondrial como factor fijo y la población (anidada dentro del linaje) como factor aleatorio. Para los análisis de los rasgos de los huevos y los juveniles, los principales efectos fueron los de la puesta (anidada dentro de población, y ésta dentro de linaje) y la población (anidada dentro de linaje) como efectos aleatorios, y el linaje mitocondrial, la temperatura y la humedad como factores fijos. Cuando se consideró apropiado, se incluyeron también variables predictoras continuas como covariables en los modelos. No se estimaron las interacciones dobles que implicaran a algún factor aleatorio, ni tampoco las interacciones triples para evitar una sobreparametrización de los modelos. El uso de la población como factor aleatorio dejó pocos grados de libertad para evaluar los efectos del linaje, convirtiendo por tanto nuestros análisis en conservadores, pero también nos permitió generalizar nuestras conclusiones acerca de los efectos de la incubación y las diferencias entre poblaciones. Puesto que en muchos casos tales diferencias fueron consistentes para ambos linajes (por ejemplo, medias mayores para las poblaciones a baja altitud tanto en el linaje occidental como en el oriental), se asumió que estaban asociadas a un gradiente que opone las condiciones xéricas de baja altitud a las condiciones más húmedas y productivas de altitudes mayores. Hemos demostrado previamente que tal gradiente es importante para las estrategias reproductivas de esta especie (Díaz 1997, Iraeta et al. 2006, 2013, Díaz et al. 2012, véase el Capítulo 3). Sin embargo, preferimos tratar a la población como factor aleatorio en un diseño anidado en vez de tratarla como factor fijo en un diseño de dos vías (linaje oriental vs. occidental x altitud baja vs. elevada) en aras de una mayor capacidad de generalización, incluso con el coste asociado de una pérdida de poder estadístico. Esta es también la razón por la que no aplicamos la corrección secuencial de Bonferroni a nuestros múltiples test estadísticos (véase Moran 2003 para una discusión relacionada de los argumentos en contra de este tipo de corrección en los estudios ecológicos). Los datos se muestran como $\text{media} \pm 1$ error estándar.

Resultados

Rasgos reproductivos de las hembras

En nuestra muestra, las hembras del linaje occidental fueron más grandes que las del linaje oriental (Tabla 4.1), sin diferencias significativas entre las poblaciones de un mismo linaje (modelo mixto de ANOVA; linaje: $F_{1, 2.01} = 70.78$, $P = 0.013$; población anidada en linaje: $F_{2, 29} = 0.38$, $P = 0.689$). El tamaño de puesta fue ligeramente mayor para las hembras occidentales que para las orientales (linaje: $F_{1, 2.00} = 28.03$, $P = 0.034$), una diferencia que fue principalmente atribuible a su mayor tamaño (modelo mixto de ANCOVA con LCC como covariable; linaje: $F_{1, 5.23} = 5.25$, $P = 0.068$; LCC: $F_{1, 28} = 7.14$, $P = 0.012$). No hubo diferencias entre los linajes en el peso medio del huevo ($F_{1, 2.01} = 3.87$, $P = 0.187$). Sin embargo, para una LCC y tamaño de puesta dados, las hembras occidentales pusieron huevos más pesados que las orientales (ANCOVA con LCC y tamaño de puesta como covariables; linaje: $F_{1, 21.97} = 5.28$, $P = 0.031$; LCC: $F_{1, 27} = 21.69$, $P < 0.0001$; tamaño de puesta: $F_{1, 27} = 26.57$, $P < 0.0001$). Como resultado, la inversión reproductiva total (es decir, el peso de la puesta) fue mayor para las hembras del linaje occidental ($F_{1, 2.02} = 174.65$, $P = 0.005$) incluso después de controlar por su mayor tamaño (ANCOVA con LCC como covariable; linaje: $F_{1, 6.95} = 10.40$, $P = 0.015$; LCC: $F_{1, 28} = 33.42$, $P < 0.0001$).

Linaje Población	Occidental		Oriental	
	El Pardo	Navacerrada	Aranjuez	Torrejoncillo
Latitud (° N)	40.511	40.726	40.016	40.035
Longitud (° E)	-3.755	-4.023	-3.586	-2.599
Altitud (m)	658	1230	594	943
P (mm)	263.9	513.0	249.6	344.7
T (°C)	18.49	12.96	17.89	17.00
N	9	7	9	8
LCC (mm)	80.11 ± 1.36	79.71 ± 1.74	71.22 ± 1.09	73.00 ± 1.85
Nº de huevos	6.7 ± 0.3	7.7 ± 0.5	4.9 ± 0.4	5.0 ± 0.4
Peso de los huevos (g)	0.44 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.40 ± 0.03
Peso de la puesta (g)	2.95 ± 0.17	3.14 ± 0.18	1.92 ± 0.13	1.96 ± 0.14

Tabla 4.1. Datos geográficos y climáticos de las localidades empleadas en este estudio (latitud, longitud, altitud, y precipitación [P] y temperatura media [T] entre marzo y octubre), linaje mitocondrial de cada población y datos reproductivos (media ± error típico) de las hembras estudiadas.

Tiempo de incubación y éxito de eclosión

El tiempo de incubación se prolongó drásticamente en el tratamiento de baja temperatura (Tabla 4.2: $F_{1, 143} = 20437.89$, $P < 0.0001$), y aumentó ligeramente en el de elevada humedad ($F_{1, 143} = 5.92$, $P = 0.016$). Los linajes no difirieron en sus tiempos medios de incubación, pero en ambos linajes los huevos de las poblaciones más elevadas eclosionaron antes que los de poblaciones situadas a menor altitud (población como factor aleatorio anidado dentro de linaje: $F_{2, 29.16} = 15.95$, $P < 0.0001$). Los demás efectos e interacciones no fueron significativos. En general, el éxito de eclosión fue elevado (91.4%), sin diferencias significativas entre linajes, poblaciones o tratamientos de humedad o temperatura.

Rasgos morfológicos de los juveniles en el momento de la eclosión

El tamaño del juvenil (LCC) mostró una fuerte dependencia de la temperatura de incubación; los huevos incubados a 24 °C produjeron juveniles más grandes (Tabla 4.2: $F_{1, 143} = 168.75$, $P < 0.0001$). La longitud de la cola mostró el patrón opuesto: las lagartijas incubadas a 32 °C eclosionaron con colas más largas que las incubadas a 24 °C ($F_{1, 143} = 15.53$, $P = 0.00013$). Dentro de ambos linajes, las lagartijas de las poblaciones de llanura mostraron colas más largas que las de poblaciones situadas a mayor altitud ($F_{2, 29.16} = 5.07$, $P = 0.0013$). Los juveniles de las poblaciones de llanura tendieron a ser más grandes que los de las poblaciones a mayor altitud ($F_{2, 29.10} = 3.23$, $P = 0.054$) para todos los tratamientos de temperatura y humedad, excepto para la comparación entre las dos poblaciones orientales a 24 °C y 10% de humedad. Los demás efectos e interacciones no fueron significativos.

Los juveniles incubados a 80% de humedad fueron más pesados que los incubados a 10%, y los incubados a 24 °C fueron más pesados que los incubados a 32 °C (humedad: $F_{1, 143} = 12.31$, $P = 0.0006$; temperatura: $F_{1, 143} = 5.93$, $P = 0.016$). Tras controlar por los efectos de la temperatura, la humedad, y el peso inicial del huevo (como un índice de la inversión materna), los juveniles de las puestas de las poblaciones de llanura fueron más pesados que los de las poblaciones situadas a mayor altitud (ANCOVA con el peso del huevo como covariable; población anidada dentro de linaje: $F_{2, 33.02} = 8.68$, $P = 0.0009$; peso inicial del huevo: $F_{1, 142} = 10.49$, $P = 0.0015$).

		El Pardo (linaje occidental)		Navacerrada (linaje occidental)		Aranjuez (linaje oriental)		Torrejuncillo (linaje oriental)	
		24 °C	32 °C	24 °C	32 °C	24 °C	32 °C	24 °C	32 °C
Tiempo de incubación (días)	10%	88.5 ± 0.9 (13)	47.9 ± 0.6 (16)	84.4 ± 0.9 (13)	45.4 ± 0.5 (11)	81.8 ± 0.6 (11)	42.9 ± 0.4 (9)	79.4 ± 0.6 (10)	40.5 ± 0.6 (10)
	80%	88.9 ± 0.7 (15)	48.0 ± 0.3 (11)	85.1 ± 0.6 (13)	46.3 ± 0.7 (12)	83.2 ± 0.8 (9)	42.7 ± 0.3 (9)	79.3 ± 0.5 (9)	40.9 ± 0.2 (10)
Peso corporal₀ (g)	10%	0.54 ± 0.02 (13)	0.54 ± 0.01 (16)	0.48 ± 0.02 (13)	0.49 ± 0.01 (11)	0.49 ± 0.02 (11)	0.48 ± 0.03 (9)	0.47 ± 0.03 (10)	0.43 ± 0.03 (10)
	80%	0.57 ± 0.01 (15)	0.54 ± 0.02 (11)	0.50 ± 0.01 (13)	0.49 ± 0.02 (12)	0.51 ± 0.02 (9)	0.51 ± 0.02 (9)	0.48 ± 0.02 (9)	0.48 ± 0.02 (10)
LCC₀ (mm)	10%	29.6 ± 0.5 (13)	27.9 ± 0.3 (16)	28.7 ± 0.4 (13)	26.8 ± 0.4 (11)	28.4 ± 0.3 (11)	26.9 ± 0.5 (9)	28.5 ± 0.5 (10)	26.0 ± 0.8 (10)
	80%	30.2 ± 0.2 (15)	27.9 ± 0.3 (11)	28.9 ± 0.3 (13)	26.8 ± 0.3 (12)	29.1 ± 0.4 (9)	27.2 ± 0.5 (9)	28.7 ± 0.5 (9)	26.5 ± 0.4 (10)
Longitud cola₀ (mm)	10%	50.5 ± 1.1 (13)	52.4 ± 1.4 (16)	49.4 ± 1.1 (13)	51.5 ± 0.6 (11)	50.2 ± 1.0 (11)	54.3 ± 1.5 (9)	46.1 ± 1.8 (10)	50.6 ± 2.2 (10)
	80%	53.2 ± 1.0 (15)	53.8 ± 1.2 (11)	49.1 ± 0.6 (13)	48.9 ± 1.5 (12)	52.2 ± 1.4 (9)	53.7 ± 1.1 (9)	48.9 ± 1.0 (9)	51.4 ± 0.9 (10)
Alimento ingerido (grillos/día)	10%	2.0 ± 0.1 (13)	2.0 ± 0.1 (16)	2.1 ± 0.1 (10)	1.7 ± 0.1 (11)	1.6 ± 0.2 (7)	2.0 ± 0.1 (9)	1.7 ± 0.1 (8)	1.6 ± 0.2 (9)
	80%	2.0 ± 0.1 (14)	2.0 ± 0.1 (11)	2.3 ± 0.1 (10)	1.8 ± 0.1 (11)	2.0 ± 0.1 (4)	2.0 ± 0.1 (8)	1.6 ± 0.1 (5)	1.7 ± 0.1 (9)
Peso corporal₃₀ (g)	10%	0.83 ± 0.05 (13)	0.90 ± 0.04 (16)	0.77 ± 0.03 (10)	0.74 ± 0.04 (11)	0.55 ± 0.05 (7)	0.75 ± 0.05 (9)	0.56 ± 0.05 (8)	0.52 ± 0.05 (9)
	80%	0.89 ± 0.02 (14)	0.92 ± 0.03 (11)	0.84 ± 0.03 (10)	0.73 ± 0.02 (11)	0.67 ± 0.06 (4)	0.72 ± 0.05 (8)	0.56 ± 0.04 (5)	0.60 ± 0.03 (9)
LCC₃₀ (mm)	10%	33.9 ± 0.5 (13)	34.3 ± 0.7 (16)	32.1 ± 0.4 (10)	32.4 ± 0.6 (11)	31.1 ± 0.6 (7)	32.4 ± 0.6 (9)	31.1 ± 0.6 (8)	29.7 ± 0.9 (9)
	80%	34.9 ± 0.3 (14)	34.6 ± 0.3 (11)	33.7 ± 0.5 (10)	32.0 ± 0.5 (11)	32.0 ± 0.8 (4)	32.9 ± 0.4 (8)	31.8 ± 0.4 (5)	31.4 ± 0.6 (9)
Longitud cola₃₀ (mm)	10%	63.8 ± 1.7 (13)	67.6 ± 1.8 (16)	60.4 ± 1.4 (10)	62.0 ± 1.3 (11)	59.9 ± 2.1 (7)	65.2 ± 2.9 (9)	54.6 ± 3.0 (8)	60.1 ± 2.9 (9)
	80%	65.6 ± 1.1 (14)	69.4 ± 1.6 (11)	62.9 ± 1.4 (10)	60.2 ± 2.5 (11)	61.8 ± 1.8 (4)	66.4 ± 1.8 (8)	58.8 ± 1.8 (5)	63.2 ± 2.0 (9)

Tabla 4.2. Tiempo de incubación de los huevos y datos fenotípicos de los juveniles de *P. algirus* (peso corporal, LCC y longitud de la cola, en el momento de la eclosión [t = 0] y después de un mes de desarrollo postnatal [t = 30], y tasa de alimentación) en función del linaje mitocondrial, la población y el tratamiento de incubación (temperatura y humedad). Los datos se presentan como media ± error típico, con el tamaño de muestra entre paréntesis.

Supervivencia y crecimiento

Un análisis log-lineal con los datos de los juveniles clasificados en función del linaje, la temperatura, la humedad y la supervivencia hasta los 30 días (χ^2 de máxima verosimilitud = 4.53, g.l. = 10, P = 0.921) mostró que los juveniles del linaje occidental tuvieron mayores índices de supervivencia que los del linaje oriental (Figura 4.1: el 96% de los juveniles occidentales sobrevivieron, frente a un 79.7% de los orientales; asociación parcial: $\chi^2 = 11.32$, g.l. = 1, P = 0.0008) y que la supervivencia fue mayor para los juveniles incubados a 32 °C que para los incubados a 24 °C (un 95.5% de los juveniles incubados a 32 °C sobrevivieron, frente a un 82.6% de los incubados a 24 °C; asociación parcial: $\chi^2 = 7.14$, g.l. = 1, P = 0.0075). Aunque la supervivencia a 24 °C fue menor en Torrejoncillo (76.5%) y especialmente en Aranjuez (57.9%) que en Navacerrada (90.1%) y El Pardo (96.4%), no se encontró ninguna interacción triple significativa (todas las P > 0.35), probablemente debido a la baja tasa de mortalidad global en nuestro experimento (solo 19 de 174 juveniles, el 10.9%, murieron durante el primer mes de vida).

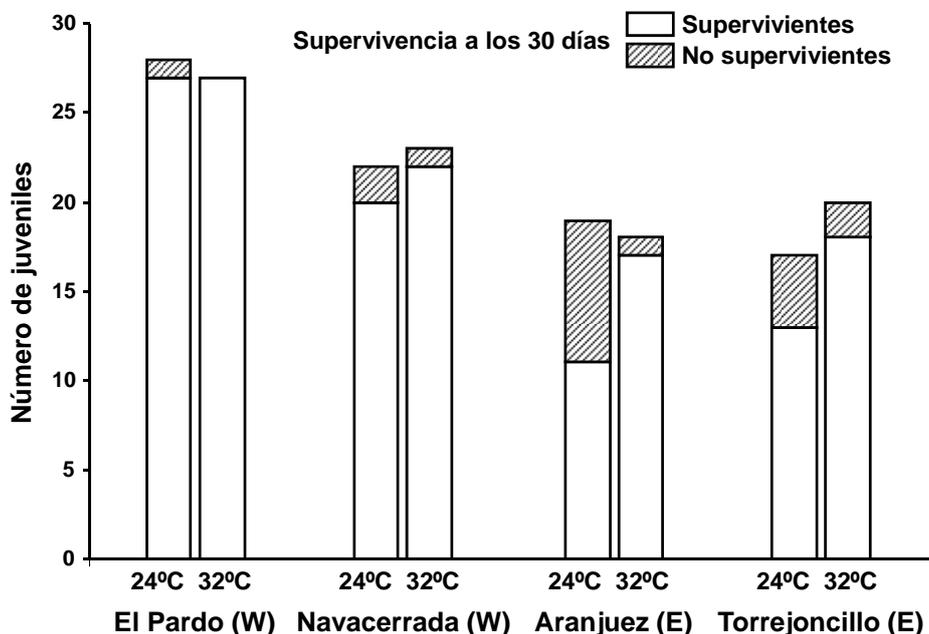


Figura 4.1. Tasa de supervivencia hasta los 30 días de los juveniles de *P. algirus* de cuatro poblaciones distintas en función de la temperatura de incubación. W y E se refieren, respectivamente, a los dos linajes de ADN mitocondrial: occidental y oriental.

Los juveniles incubados a 32 °C crecieron en promedio un 50% más rápido durante el primer mes de vida que los incubados a 24 °C (Figura 4.2, tasa de crecimiento en LCC: $F_{1, 117} = 54.17$, $P < 0.00001$). Estas diferencias permanecieron altamente significativas después de controlar por los efectos de la tasa de alimento ingerido, estimada como el número medio de grillos consumidos por día (ANCOVA con la tasa de ingestión de alimento como covariable; temperatura: $F_{1, 116} = 88.24$, $P < 0.00001$; alimento ingerido: $F_{1, 116} = 61.93$, $P < 0.00001$). Las lagartijas occidentales tuvieron tasas

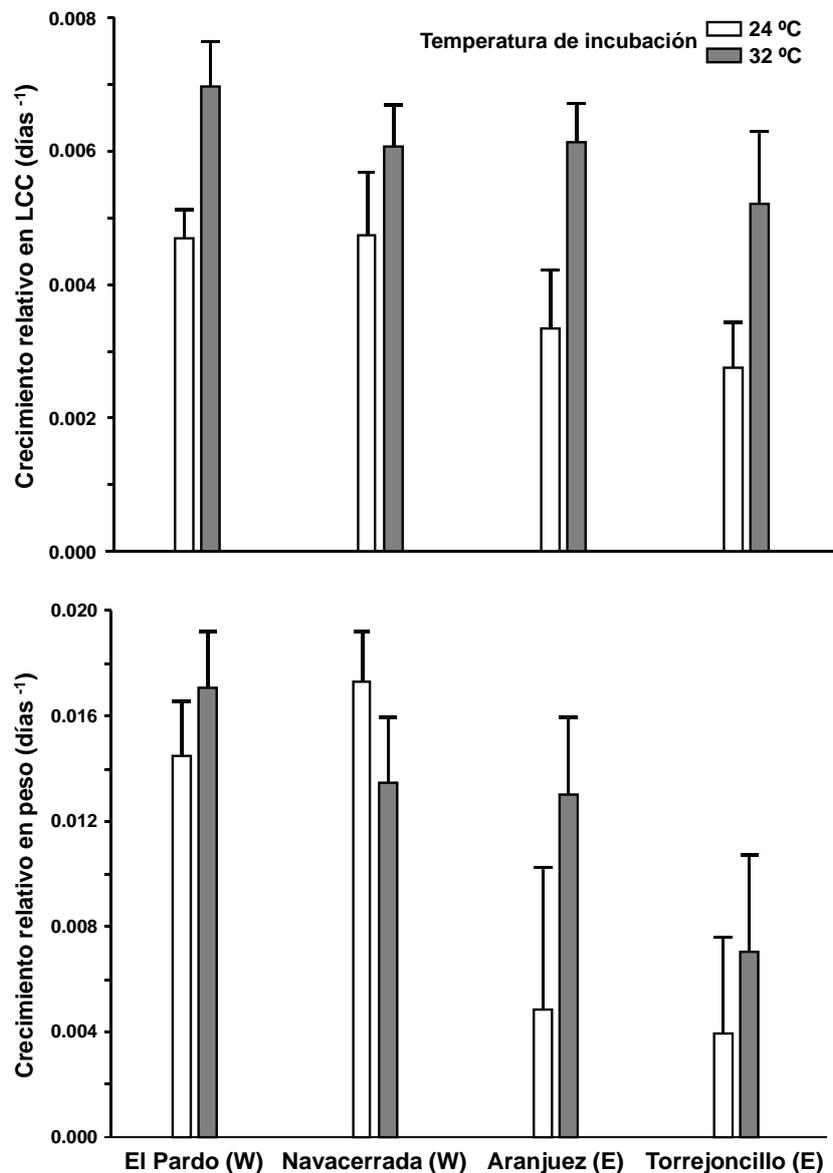


Figura 4.2. Tasas de crecimiento durante los primeros 30 días de los juveniles de *P. algirus* de cuatro poblaciones distintas en función de la temperatura de incubación. W y E se refieren, respectivamente, a los dos linajes de ADN mitocondrial: occidental y oriental. Arriba se muestra la tasa de crecimiento en longitud cabeza-cloaca (LCC) y abajo se muestra la tasa de crecimiento en peso.

de alimentación marginalmente mayores que las orientales (Tabla 4.2), especialmente cuando se incubaron a baja temperatura (interacción linaje x temperatura: $F_{1, 117} = 4.42$, $P = 0.038$). Las tasas de ganancia de peso fueron mayores para las lagartijas occidentales que para las orientales (Figura 4.2: $F_{1, 2.26} = 25.77$, $P = 0.028$), y en el caso de los individuos orientales, fueron mayores para las lagartijas incubadas a 32 °C que para las incubadas a 24 °C (interacción linaje x temperatura: $F_{1, 117} = 5.46$, $P = 0.021$). Sin embargo, las lagartijas occidentales, y las incubadas a 32 °C, siguieron ganando peso más rápido que las lagartijas orientales y que las incubadas a 24 °C, respectivamente, una vez controlados los efectos del alimento ingerido (ANCOVA con el alimento ingerido como covariable; linaje: $F_{1, 2.40} = 37.07$, $P = 0.016$; temperatura: $F_{1, 116} = 15.26$, $P = 0.00016$; alimento: $F_{1, 116} = 221.22$, $P < 0.00001$).

Puesto que los juveniles incubados a 32 °C crecieron más rápido que los incubados a 24 °C (tanto en LCC como en peso), tras un mes pudieron compensar su desventaja inicial en tamaño, por lo que el tratamiento de temperatura no tuvo efectos significativos en la LCC o el peso corporal a la edad de 30 días (todas las P 's > 0.25). Sin embargo, algunos de los demás efectos presentes en el momento de la eclosión aún fueron evidentes a los 30 días. Así, los juveniles de un mes de edad de las poblaciones de baja altitud fueron mayores (Tabla 4.2: $F_{2, 33.53} = 7.92$, $P = 0.0015$) y más pesados ($F_{2, 33.71} = 7.40$, $P = 0.0022$) que los de las poblaciones elevadas, y los juveniles incubados a 80% de humedad fueron más largos ($F_{2, 117} = 7.59$, $P = 0.0068$) que los incubados a 10%. La longitud de la cola fue la única variable para la cual los efectos de la temperatura presentes al eclosionar fueron todavía aparentes tras un mes: los juveniles incubados a 32 °C mostraron colas más largas que los incubados a 24 °C ($F_{1, 117} = 28.89$, $P = 0.0003$). De nuevo, los juveniles de poblaciones de llanura tuvieron colas más largas que los de las poblaciones elevadas ($F_{1, 33.00} = 7.36$, $P = 0.0023$).

Capacidad locomotora

Las carreras tuvieron lugar entre 37 y 47 días tras la eclosión (media \pm error estándar = 40.4 ± 0.1). A esa edad, los juveniles de las poblaciones de llanura siguieron siendo más largos, más pesados y con colas más largas que aquellos procedentes de las poblaciones de mayor altitud, y los juveniles incubados a 80% de humedad siguieron siendo más largos que los incubados a 10% (análisis no mostrados). Sin embargo, es importante destacar que la mayor tasa de crecimiento de los juveniles incubados a 32 °C

		El Pardo (linaje occidental)		Navacerrada (linaje occidental)		Aranjuez (linaje oriental)		Torrejocillo (linaje oriental)	
		24 °C	32 °C	24 °C	32 °C	24 °C	32 °C	24 °C	32 °C
Peso corporal (g)	10%	0.87 ± 0.07 (10)	0.96 ± 0.04 (15)	0.77 ± 0.03 (8)	0.81 ± 0.05 (9)	0.62 ± 0.06 (5)	0.82 ± 0.05 (6)	0.62 ± 0.04 (7)	0.73 ± 0.07 (5)
	80%	0.93 ± 0.04 (11)	1.00 ± 0.03 (9)	0.89 ± 0.06 (6)	0.75 ± 0.02 (10)	0.69 ± 0.05 (4)	0.79 ± 0.08 (6)	0.58 ± 0.02 (3)	0.72 ± 0.05 (7)
LCC (mm)	10%	34.8 ± 0.7 (10)	35.9 ± 0.5 (15)	33.0 ± 0.4 (8)	33.4 ± 0.7 (9)	32.2 ± 0.4 (5)	34.2 ± 0.8 (6)	32.0 ± 0.6 (7)	32.6 ± 0.8 (5)
	80%	35.6 ± 0.4 (11)	36.6 ± 0.4 (9)	34.2 ± 0.6 (6)	32.7 ± 0.4 (10)	32.8 ± 0.9 (4)	34.8 ± 1.0 (6)	31.7 ± 0.3 (3)	33.4 ± 0.8 (7)
Longitud de la cola (mm)	10%	65.8 ± 2.4 (10)	70.5 ± 1.6 (15)	63.6 ± 1.3 (8)	64.9 ± 1.3 (9)	63.8 ± 2.6 (5)	67.3 ± 3.2 (6)	58.7 ± 2.2 (7)	68.2 ± 3.5 (5)
	80%	67.8 ± 1.3 (11)	71.4 ± 0.9 (9)	63.8 ± 1.5 (6)	62.2 ± 2.8 (10)	64.3 ± 2.3 (4)	68.8 ± 2.5 (6)	58.3 ± 0.9 (3)	67.4 ± 2.3 (7)
Número de sprints	10%	4.1 ± 0.6 (10)	6.7 ± 0.8 (15)	6.0 ± 1.0 (8)	5.8 ± 0.5 (9)	4.2 ± 0.8 (5)	5.7 ± 1.2 (6)	3.1 ± 0.3 (7)	6.0 ± 1.2 (5)
	80%	4.5 ± 0.6 (11)	8.7 ± 1.1 (9)	4.3 ± 1.0 (6)	6.2 ± 0.9 (10)	4.3 ± 0.8 (4)	3.7 ± 0.7 (6)	3.5 ± 1.0 (4)	5.0 ± 0.8 (7)
Velocidad media (cm/s)	10%	78.1 ± 4.5 (10)	86.4 ± 3.7 (15)	77.5 ± 2.6 (8)	79.7 ± 2.4 (9)	79.1 ± 7.1 (5)	81.1 ± 4.0 (6)	69.7 ± 2.7 (7)	85.5 ± 2.6 (5)
	80%	79.0 ± 3.2 (11)	79.1 ± 3.9 (9)	85.5 ± 4.7 (6)	82.7 ± 2.8 (10)	82.7 ± 6.5 (4)	80.9 ± 3.2 (6)	76.1 ± 1.9 (4)	75.0 ± 3.6 (7)
Velocidad máxima (cm/s)	10%	92.3 ± 4.6 (10)	102.5 ± 4.5 (15)	90.2 ± 4.1 (8)	91.5 ± 3.9 (9)	90.6 ± 9.4 (5)	95.4 ± 7.4 (6)	78.7 ± 3.7 (7)	104.2 ± 6.0 (5)
	80%	91.2 ± 3.3 (11)	94.7 ± 5.7 (9)	103.7 ± 7.7 (6)	97.4 ± 3.9 (10)	96.4 ± 6.3 (4)	91.3 ± 6.1 (6)	83.8 ± 3.2 (4)	85.4 ± 4.6 (7)
Distancia media (cm)	10%	50.3 ± 5.6 (10)	35.4 ± 4.5 (15)	30.7 ± 4.0 (8)	34.3 ± 3.2 (9)	35.9 ± 5.6 (5)	34.4 ± 6.2 (6)	40.9 ± 3.6 (7)	33.0 ± 4.5 (5)
	80%	41.7 ± 5.0 (11)	30.6 ± 2.0 (9)	50.1 ± 10.8 (6)	35.1 ± 5.6 (10)	42.3 ± 8.4 (4)	31.0 ± 5.3 (6)	49.4 ± 7.7 (4)	27.5 ± 3.2 (7)
Distancia máxima (cm)	10%	75.5 ± 8.7 (10)	50.3 ± 5.7 (15)	43.9 ± 3.6 (8)	52.7 ± 5.2 (9)	56.0 ± 12.8 (5)	51.8 ± 10.2 (6)	56.7 ± 8.0 (7)	52.4 ± 9.2 (5)
	80%	67.9 ± 8.9 (11)	58.4 ± 5.1 (9)	76.8 ± 20.2 (6)	53.1 ± 9.1 (10)	71.3 ± 16.0 (4)	48.0 ± 10.8 (6)	62.3 ± 10.8 (4)	41.3 ± 8.7 (7)
Distancia total (cm)	10%	206.0 ± 46.4 (10)	221.1 ± 32.2 (15)	169.6 ± 20.4 (8)	193.7 ± 17.6 (9)	149.6 ± 34.5 (5)	170.7 ± 22.1 (6)	128.3 ± 17.5 (7)	203.2 ± 55.4 (5)
	80%	175.3 ± 21.5 (11)	253.7 ± 26.2 (9)	188.3 ± 35.0 (6)	195.5 ± 28.2 (10)	179.8 ± 43.0 (4)	119.0 ± 38.8 (6)	170.0 ± 48.3 (4)	132.9 ± 20.8 (7)

Tabla 4.3. Variables fenotípicas (peso corporal, LCC y longitud de la cola) y de capacidad y estrategia locomotora a una edad aproximada de 40 días (véase el texto para más detalles) de los juveniles de *P. algirus* en función del linaje mitocondrial, la población y el tratamiento de incubación (temperatura y humedad). Los datos se presentan como media ± error típico, con el tamaño de muestra entre paréntesis.

les permitió sobrecompensar su menor tamaño al eclosionar y superar los valores de LCC (Tabla 4.3: $F_{1, 84} = 12.75$, $P = 0.0006$) y de peso corporal ($F_{1, 84} = 10.82$, $P = 0.0015$) de los juveniles incubados a 24 °C.

El número de *sprints* por carrera fue mayor para los juveniles occidentales que para los orientales ($F_{1, 5.44} = 33.58$, $P = 0.0016$) y para los juveniles incubados a 32 °C que para los incubados a 24 °C ($F_{1, 85} = 7.84$, $P = 0.0063$), aunque estos resultados fueron principalmente atribuibles a los efectos de las diferencias en tamaño corporal (ANCOVA con LCC como covariable; linaje: $F_{1, 2.31} = 0.26$, $P = 0.657$; temperatura: $F_{1, 83} = 3.21$, $P = 0.077$; LCC: $F_{1, 83} = 8.56$, $P = 0.004$). La velocidad media de los *sprints* no mostró diferencias entre linajes, poblaciones o tratamientos de temperatura o humedad (análisis no mostrados). La velocidad máxima fue también similar para las poblaciones anidadas dentro de linajes, o los tratamientos de temperatura y humedad, aunque las lagartijas occidentales fueron marginalmente más rápidas que las orientales ($F_{1, 3.10} = 10.63$, $P = 0.045$). En promedio, las lagartijas incubadas a 24 °C mostraron distancias por *sprint* más largas que las incubadas a 32 °C ($F_{1, 85} = 8.38$, $P = 0.0048$); esto compensó su menor número de *sprints* e hizo que el tratamiento de temperatura no tuviera efectos significativos en la distancia total recorrida en la carrera ($F_{1, 85} = 0.459$, $P = 0.500$). Por otro lado, las distancias recorridas en los *sprints* fueron similares para las lagartijas occidentales y orientales ($F_{1, 2.44} = 0.219$, $P = 0.678$), y como consecuencia de ello, los juveniles occidentales, que realizaron más *sprints* por carrera, recorrieron mayores distancias totales que los orientales ($F_{1, 6.92} = 53.34$, $P = 0.0002$).

Discusión

Encontramos diferencias en las respuestas fenotípicas a la variación experimental de la temperatura de incubación y de la humedad del sustrato de incubación entre 1) los linajes filogeográficos y 2) las poblaciones del mismo linaje enfrentadas a diferentes condiciones ambientales. Estas respuestas causaron efectos a corto y largo plazo en diversos rasgos relacionados con la eficacia biológica, como el tamaño corporal, la tasa de crecimiento, la capacidad locomotora o incluso la supervivencia de los juveniles. En esta sección trataremos de integrar todos estos resultados, interpretándolos desde un escenario adaptativo que pueda explicar la evolución y mantenimiento de los patrones observados de variación fenotípica.

En lo referente a la inversión reproductiva de las hembras adultas, nuestros resultados apoyan y extienden otros hallazgos previos (véase el Capítulo 3) que demuestran que las hembras de ambientes más húmedos y productivos alcanzan mayores tamaños, y como consecuencia ponen más huevos, que sus congéneres de localidades más áridas y menos productivas (Iraeta et al. 2006, 2013, Díaz et al. 2012). Sin embargo, en nuestro estudio este efecto fue evidente al comparar los linajes filogeográficos (con las hembras occidentales siendo más grandes y poniendo más huevos que las orientales), pero no al comparar las poblaciones de un mismo linaje situadas a distinta altitud, a pesar de que las diferencias altitudinales han sido el principal foco atención en estudios previos acerca de esta especie (Iraeta et al. 2008, 2013). Por otra parte, en el Capítulo 3 hemos visto que la comparación de un elevado número de poblaciones de ambos linajes no fue capaz de revelar diferencias entre linajes en el tamaño medio de puesta, probablemente debido a un elevado componente de varianza intrapoblacional (Díaz et al. 2012). Así, parece razonable concluir que el tamaño de puesta, como componente fundamental de la fecundidad, está influenciado directa o indirectamente (a través de diferencias en el tamaño corporal de las hembras) por las diferencias ambientales en la productividad, las cuales pueden operar a diferentes escalas espaciales (diferentes elevaciones, zonas bioclimáticas occidentales vs. orientales) y pueden eventualmente traducirse en diferencias intrínsecas entre los linajes. La mayor productividad de las poblaciones occidentales está apoyada, en una escala biogeográfica más amplia, por los mayores niveles de precipitación registrados entre marzo y octubre en las localidades occidentales (Díaz et al. 2012, véase el Capítulo 3), y es consistente con la existencia de un amplio gradiente ambiental que recorre la Península Ibérica desde el noroeste, más húmedo y frío, hasta el sureste, más cálido y seco (Ninyerola et al. 2005).

Además del tamaño de puesta, también hubo diferencias en el peso medio del huevo y en el peso de la puesta, siendo mayor el peso medio de los huevos en las hembras occidentales que en las orientales (tras controlar por los efectos del tamaño de la hembra y de la puesta). Como resultado, la inversión reproductiva total (es decir, el peso de la puesta) fue también mayor para las hembras occidentales, puede que indicando unas peores condiciones ambientales para las poblaciones del linaje oriental; un impacto negativo de las condiciones ambientales adversas en el rendimiento reproductivo ha sido demostrado en situaciones de fragmentación del hábitat (Díaz et al.

2005). Se podría argumentar que nuestros resultados podrían estar sesgados debido a diferencias entre los linajes en la frecuencia de segundas puestas. Sin embargo, hemos documentado con anterioridad una frecuencia más alta de segundas puestas en una población occidental de llanura (El Pardo) que en una población oriental cercana al límite septentrional de la distribución de la especie (Díaz et al. 2007), lo que sugiere que no existe tal sesgo.

A tenor de lo esperado, los tiempos de incubación fueron dependientes de la temperatura, con duraciones más cortas a altas temperaturas. La humedad tuvo un efecto mucho más pequeño, pero aún significativo, en la duración de la incubación: los niveles altos de humedad retrasaron la eclosión aproximadamente un día, especialmente a bajas temperaturas de incubación. Esto es interesante porque implica que los menores tiempos de incubación registrados en las poblaciones de altitud elevada, en donde la temperatura es menor y la humedad del suelo es mayor, sugieren que la variación contragradiante relacionada tanto con la temperatura como con la humedad ha evolucionado de forma independiente en los dos linajes (Díaz et al. 2012, véase el Capítulo 3). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los linajes en la duración media de la incubación, a pesar de los menores niveles de precipitación de las localidades orientales en comparación con las occidentales. Este resultado, que contrasta con análisis previos basados en un muestreo más amplio de poblaciones (Díaz et al. 2012, Capítulo 3), probablemente se encuentre relacionado con una baja potencia estadística (solamente dos poblaciones por linaje, con un alto componente de variación entre poblaciones debido a diferencias en los tiempos medios de incubación atribuibles a los efectos del clima). También merece la pena comentar que nuestros datos no consiguieron confirmar que los huevos occidentales estuvieran peor adaptados que los orientales a condiciones de incubación más secas, quizás porque un 10% de agua es todavía más húmedo que el umbral fisiológicamente limitante para la eclosión (pero véase Booth 2004). Esto viene apoyado por el hecho de que el éxito general de eclosión fue incuestionablemente alto (91.4%), sin diferencias significativas entre linajes, poblaciones o tratamientos de incubación.

La incubación a 24 °C produjo juveniles más grandes con colas más cortas que los incubados a 32 °C. Una correlación negativa entre la temperatura de incubación y el tamaño corporal se ha documentado para ésta y otras especies (Shine y Harlow 1996, Elphick y Shine 1998, Braña y Ji 2000, Monasterio et al. 2011), y podría ser debida a

los tiempos de incubación más largos a bajas temperaturas, que permitirían a los recién eclosionados alcanzar mayores tamaños a pesar de sus tasas de desarrollo más bajas. Es un hecho conocido el que las altas temperaturas acortan la incubación y aceleran el metabolismo (Deeming 2004), pero el balance entre estos dos procesos y sus efectos combinados sobre el tamaño del juvenil no se han documentado con tanta claridad, con diferentes estudios en varias especies mostrando que los juveniles incubados a bajas temperaturas pueden ser más pequeños (Telemeco et al. 2010, Rodríguez-Díaz et al. 2010), similares (Qualls y Shine 1998, Booth et al. 2000, Du et al. 2005b, Parker y Andrews 2007, Buckley et al. 2010), o más grandes (Shine y Harlow 1996, Elphick y Shine 1998, Braña y Ji 2000, Monasterio et al. 2011) que los incubados a temperaturas más altas. En nuestro caso, parece que el acortamiento de la incubación superó los efectos del incremento en el metabolismo, ya que el tamaño decreció a temperaturas altas, aunque este efecto desapareció al cabo de un mes (véase más abajo), lo que significa que la supuesta correlación con la eficacia biológica es, en el mejor de los casos, efímera.

Es interesante destacar que las lagartijas incubadas a altas temperaturas, y las procedentes de poblaciones de llanura, independientemente de su linaje, eclosionaron con colas más largas que sus congéneres incubadas a baja temperatura o provenientes de poblaciones a mayor altitud. Las colas de los lagartos pueden tener funciones relacionadas con el cortejo, el almacenamiento de grasa, la defensa o la locomoción (Vitt et al. 1977), pero la autotomía caudal, o la habilidad para perder la cola en respuesta al ataque de un depredador, es probablemente su uso más extendido (Bellairs y Bryant 1985, Bateman y Fleming 2009), representando una de las principales tácticas antidepredatorias en especies de más de la mitad de las familias de lagartos (Downes y Shine 2001). Más aún, la autotomía de la cola es especialmente importante como mecanismo antidepredatorio para los juveniles porque sus capacidades locomotoras no están plenamente desarrolladas. Comparados con los adultos, los juveniles permiten un acercamiento mayor de los depredadores, emplean más tiempo en encontrar refugio y es más probable que permanezcan visibles (Whiting et al. 2003). A consecuencia de ello, tener colas más largas puede ayudar a incrementar su supervivencia. Nuestros datos son consistentes con este escenario, dados los rasgos que producen lagartijas con colas largas. En primer lugar, los juveniles eclosionaron con colas más largas cuando fueron incubados a altas temperaturas, que pueden ser interpretadas como indicativas de la

actividad tras la eclosión y el aumento del riesgo de depredación asociado (Rose 1981). En segundo lugar, los juveniles tuvieron colas más largas en los hábitats mediterráneos de baja altitud, en donde las lagartijas se han de enfrentar a riesgos de depredación más altos, a juzgar por sus frecuencias más altas de autotomía en la naturaleza (Iraeta et al. 2012), quizás atribuibles a una menor disponibilidad de refugios en este tipo de hábitats (Iraeta et al. 2010). Más aún, los hábitats de llanura poseen en promedio temperaturas más elevadas, lo que puede resultar en condiciones de incubación más cálidas (tanto en el oviducto como después de la puesta) que pueden contribuir a producir juveniles con colas más largas.

Los juveniles fueron más pesados al proceder de huevos incubados a alta humedad y/o a baja temperatura, probablemente como consecuencia de una mayor tasa de absorción de agua y de un desarrollo más largo. De forma similar, los juveniles de las poblaciones de llanura fueron más pesados que los de poblaciones situadas a mayor altitud tras controlar por los efectos de la temperatura, la humedad y el peso del huevo. Estos efectos fueron en gran medida independientes del tamaño corporal, indicando que los embriones tuvieron un mayor contenido en agua y/o una mejor condición física, aspectos que pueden resultar decisivos a la hora de hacer frente a las duras condiciones estivales de las llanuras xéricas mediterráneas (Iraeta et al. 2006, 2008).

Después de 30 días bajo condiciones de entorno común, los juveniles incubados a altas temperaturas crecieron marcadamente más rápido que los incubados a baja temperatura (Qualls y Andrews 1999). Este resultado, además, no pudo ser explicado por diferencias en la tasa de alimento ingerido, puesto que el número medio de grillos consumidos no varió entre tratamientos de temperatura. Por tanto, debemos asumir diferencias bioquímicas o metabólicas, que permitirían a los juveniles incrementar la eficacia digestiva o disminuir el gasto metabólico (Sears 2005), para explicar el patrón observado. De hecho, los modelos teóricos predicen que la temperatura de incubación puede afectar al coeficiente de conversión de energía durante el desarrollo embrionario (Angilletta et al. 2000), con periodos de incubación más largos traducándose en un mayor gasto metabólico debido a los mayores costes de mantenimiento durante el desarrollo (Booth et al. 2000). Todos estos efectos conducirían en última instancia a los juveniles incubados a alta temperatura a alcanzar a sus hermanos incubados a baja temperatura a pesar de que éstos nacieran más grandes.

La aparente ventaja de los juveniles incubados a 32 °C pareció ser un efecto duradero en el tiempo, como indica el hecho de que durante el corto intervalo (de aproximadamente 10 días) entre el final del experimento de crecimiento y la evaluación de la capacidad locomotora, en el que las lagartijas fueron mantenidas bajo condiciones estandarizadas pero más “naturales”, los juveniles incubados a alta temperatura fueron capaces de sobrepasar a los incubados a baja temperatura, compensando de este modo su aparente mal inicio. Además, esto refuerza la idea de que el mayor tamaño al eclosionar de los juveniles incubados a baja temperatura fue más bien un resultado colateral de una eclosión retardada que un rasgo fenotípico verdaderamente ventajoso, como se pudo confirmar por el menor número de juveniles incubados a baja temperatura, especialmente aquellos del linaje oriental, que sobrevivieron hasta la edad de 30 días (véanse Elphick y Shine 1998, y Qualls y Andrews 1999, para resultados similares). Como corolario, nuestros datos enfatizan la necesidad de monitorizar durante un periodo de tiempo lo suficientemente prolongado las consecuencias de los tratamientos de incubación sobre los fenotipos postnatales, ya que los fenotipos al eclosionar pueden resultar engañosos (Metcalfé y Monaghan 2001, Radder et al 2007).

Puesto que las tasas de crecimiento no mostraron diferencias entre los tratamientos de humedad, se puede concluir que los efectos de la humedad sobre el tamaño corporal, aunque menores que los de la temperatura, tuvieron consecuencias fenotípicas más duraderas, y por tanto no deberían descartarse como poco importantes, ya que los huevos incubados al 80% de humedad produjeron juveniles que tras un mes de crecimiento eran todavía más grandes que aquellos incubados al 10% de humedad. De nuevo, no se pudo confirmar que los juveniles occidentales estuvieran peor adaptados que los orientales a condiciones más secas de incubación, puesto que no se encontró ninguna interacción entre los efectos del linaje y los del tratamiento de humedad. Esto refuerza la idea de que un 10% de contenido en agua en el sustrato de incubación puede ser suficiente para las necesidades fisiológicas de los huevos, embriones y juveniles de esta especie mediterránea.

En general, el periodo de crecimiento postnatal apoyó la conclusión de que los juveniles occidentales estuvieron en mejor condición que los orientales a una edad de 30 días, ya que sobrevivieron mejor, comieron más grillos (sobre todo los juveniles procedentes de huevos incubados a baja temperatura) y ganaron peso más rápidamente, incluso tras controlar por los efectos de la ingestión de alimento. Curiosamente, se

encontró una interacción marginalmente significativa entre los efectos de la temperatura de incubación y el linaje en la cantidad de alimento consumido; esa interacción habría sido mayor si hubiéramos considerado las tasas de ingestión de alimento de aquellos individuos –principalmente de origen oriental incubados a baja temperatura– que murieron antes de alcanzar la edad de 30 días. Combinadas, todas estas líneas de evidencia sugieren que los embriones y juveniles de esta especie encuentran dificultades en el desarrollo cuando son incubados a baja temperatura (Monasterio et al. 2011), especialmente si pertenecen al linaje oriental. Esta respuesta diferencial a las condiciones ambientales durante la incubación puede también contribuir a crear una “frontera fisiológica” para la expansión de las hembras orientales, lo cual podría explicar el aparente aislamiento entre ambos linajes, aunque tal frontera podría cambiar rápidamente bajo el actual contexto de cambio climático (Chamaillé-Jammes et al. 2006).

Las diferencias entre las poblaciones de un mismo linaje fueron todavía evidentes tras un mes de crecimiento postnatal, puesto que las lagartijas de llanura fueron mayores (confirmando así la tendencia no significativa detectada en el momento de la eclosión), más pesadas y con colas más largas (Tabla 4.2). Tales diferencias, presumiblemente de naturaleza adaptativa, son consistentes con hallazgos previos que han documentado los mayores tamaños y las tasas de crecimiento más rápidas bajo condiciones de entorno común de los juveniles occidentales provenientes de ambientes mediterráneos áridos (Iraeta et al. 2006, 2013). La sugerencia de que estos rasgos hayan sido modelados por la selección natural se encuentra apoyada por el hecho de que este patrón geográfico aparezca de forma convergente tanto en las lagartijas orientales como en las occidentales (Capítulo 3 y resultados de este capítulo). De forma llamativa, todos estos efectos (es decir, el que los juveniles de zonas a menor altitud sean más largos, pesados y con colas más largas que los de poblaciones situadas a mayor altitud) y aquellos relativos a la humedad (que los juveniles incubados a 80% de humedad sean más pesados que los incubados a 10% de humedad), eran todavía válidos al comienzo de las carreras, cuando las lagartijas habían permanecido una media de 10 días bajo condiciones estandarizadas pero más semejantes a las “naturales” en época otoñal, es decir, con oportunidades limitadas para la termorregulación.

Una limitación obvia de nuestro enfoque es que no hemos sido capaces de identificar sitios naturales de puesta en esta especie, y por tanto carecemos de cualquier

tipo de información acerca de las condiciones de incubación en el campo (pero véase Valladolid y González-Fernández 2003, y Pleguezuelos et al. 2004). Se sabe que las hembras de los reptiles ovíparos pueden manipular los fenotipos de sus crías mediante la selección cuidadosa de las características ambientales de los sitios de puesta (Shine y Harlow 1996, Kolbe y Janzen 2002, Blouin-Demers et al. 2004, Iraeta et al. 2007, Reedy et al. 2013). Por lo tanto, la selección del sitio de puesta puede tamponar en gran medida las diferencias ambientales. Sin embargo, esto implicaría que las hembras de localidades menos idóneas (por ejemplo, las localidades frías a mayor altitud, o las zonas más secas a baja altitud) emplearían más tiempo y energía buscando sitios de puesta con la combinación óptima de temperatura y humedad para la incubación de sus huevos.

No se encontraron diferencias en la capacidad locomotora (es decir, en la velocidad de los *sprint*) entre linajes, poblaciones, o tratamientos de temperatura o humedad. Así, nuestros resultados apoyan la rigidez evolutiva de la fisiología térmica (Hertz et al. 1983, Crowley 1985, Van Damme et al. 1990), sugiriendo que la dependencia térmica de la velocidad de *sprint* ha evolucionado con independencia de las condiciones de incubación y es resistente a los cambios direccionales. Sin embargo, estos resultados deberían ser considerados con cautela, dado que fueron obtenidos en experimentos de laboratorio, y puede que no reflejen el comportamiento de las lagartijas en el campo (Irschick y Garland 2001, Losos et al. 2002, Irschick et al. 2005).

Por otro lado, sí se encontraron diferencias en la estrategia de huida. De nuevo, los efectos de la temperatura fueron claros, puesto que los juveniles de ambos linajes incubados a 32 °C realizaron un mayor número de *sprints* más cortos que los incubados a 24 °C. Más sorprendente fue el efecto del linaje, ya que los juveniles occidentales realizaron más *sprints*, pero no más cortos, que los orientales; el resultado global fue que la distancia total recorrida, que podría interpretarse como un índice válido de resistencia locomotora, fue mayor para los juveniles occidentales que para los orientales. Estudios previos han mostrado que en el iguánido *Sceloporus occidentalis*, los juveniles meridionales corren más rápido y muestran mayor resistencia que los septentrionales. Sin embargo, la ingeniería alométrica ha demostrado que solamente las diferencias en resistencia, pero no en velocidad, siguen siendo significativas tras eliminar de forma experimental la influencia del tamaño corporal (Sinervo y Huey 1990). Esto contrasta con nuestros resultados, puesto que en nuestros análisis los efectos significativos tanto de la temperatura de incubación como del linaje filogeográfico

desaparecieron tras controlar los efectos del tamaño corporal, enfatizando así la importancia ecológica del tamaño corporal como un rasgo asociado con la eficacia biológica (Sinervo et al. 1992) y modulado por la inversión materna (Iraeta et al. 2013), la temperatura de incubación, y el ambiente de crecimiento (Iraeta et al. 2006), aunque una adecuada confirmación de los efectos del tamaño corporal sobre la fisiología y la eficacia biológica (Arnold 1983) requeriría manipular experimentalmente dicho tamaño (Sinervo y Huey 1990, Sinervo y Licht 1991, Sinervo et al. 1992).

Se podría argumentar también que las lagartijas occidentales tuvieron mayores niveles de resistencia, y corrieron marginalmente más rápido que las orientales, porque la estrategia de huida de estas últimas podría basarse más en la crípsis que en la capacidad locomotora (Bauwens y Thoen 1981, Iraeta et al. 2010). Si la probabilidad de que un animal sea depredado depende primeramente de si es detectado o no por un depredador, más que de la rapidez con la que puede escapar (Schwarzkopf y Shine 1992), la capacidad locomotora y la resistencia serán selectivamente menos importantes en hábitats con una estructura de vegetación más abierta y parcheada. En tal caso, y asumiendo una cobertura mayor de las formaciones arbustivas y herbáceas y una menor cobertura forestal en los hábitats orientales (lo que viene apoyado por el desarrollo de un patrón rayado de coloración dorsal presuntamente evolucionado para incrementar la crípsis, véase el Capítulo 6), las lagartijas orientales no necesitarían correr tan rápido y/o distancias tan largas como las occidentales porque podrían y deberían permanecer más cerca de los refugios (Iraeta et al. 2010).

En resumen, nuestros resultados muestran que la temperatura de incubación fue la principal fuente de variación fenotípica para los recién eclosionados y juveniles de *P. algirus*. Sin embargo, no todos los efectos de la temperatura de incubación fueron evidentes al eclosionar, porque los juveniles incubados a alta temperatura, aunque más pequeños que los incubados a temperaturas menores, fueron capaces de sobrevivir mejor y crecer más rápido durante el primer mes de vida. Además, también detectamos diferencias entre los linajes filogeográficos en la sensibilidad térmica de sus embriones durante la incubación, siendo el linaje occidental más tolerante a la incubación a temperaturas bajas. Dado que el linaje oriental ocupa áreas más secas y cálidas y se ve más severamente afectado por las bajas temperaturas de incubación, sugerimos que tales diferencias pueden haber limitado la expansión del linaje oriental hacia regiones ibéricas más occidentales.

V. Capítulo 5

**El uso de marcadores nucleares revela la existencia de flujo génico
entre linajes mitocondriales del lacértido *Psammodromus algirus***

El uso de marcadores nucleares revela la existencia de flujo génico entre linajes mitocondriales del lacértido *Psammodromus algirus*

Resumen. La utilización de distintos marcadores es una metodología cada vez más empleada en los estudios de ecología molecular. Por un lado, los análisis con ADN mitocondrial son útiles para descubrir la historia y posibles patrones filogeográficos de una especie. Por otro lado, marcadores con elevadas tasas de mutación, como los microsátélites, permiten estimar los niveles de flujo génico entre poblaciones en periodos de tiempo más recientes. En este estudio aprovechamos la información de secuencias mitocondriales y siete loci de microsátélites para identificar distintos niveles de estructura poblacional en *Psammodromus algirus*. El análisis de 318 secuencias mitocondriales de 36 poblaciones ibéricas produjo 60 haplotipos distintos, agrupados en dos linajes principales: un linaje occidental con dos clados situados al SO y NO de la Península Ibérica (W1 y W2, respectivamente) y un linaje oriental con tres clados, el primero restringido al SE (E1), el segundo distribuido por casi toda la mitad oriental (E2) y el tercero en el centro de la Península (E3) con una distribución alopátrida respecto al anterior. La topología de la red de haplotipos, los análisis de *mismatch distribution* y las estimas de R_2 apoyaron la idea de que los clados del norte (W2, E2 y E3), pero no los del sur (E1 y W1), tienen la estructura típica de poblaciones en expansión demográfica. Sin embargo, los microsátélites de una submuestra de 9 poblaciones pusieron de manifiesto un patrón distinto al del ADN mitocondrial, con un grupo de poblaciones en el centro de la Península caracterizado por presentar elevados niveles de flujo y por incluir poblaciones con haplotipos de los clados W2 y E3, así como la única población detectada con haplotipos de ambos linajes (W1 y E3). Por otra parte, la aparición sintópica de haplotipos E2 y E3 fue la única situación de mezcla geográficamente verosímil que no se detectó en nuestros muestreos. La hipótesis que proponemos para explicar este patrón filogeográfico es que el clado E3, tras haberse diferenciado en algún refugio pleistocénico del interior peninsular, se habría expandido al retirarse los hielos hasta establecer contacto por el norte y el oeste, puede que en época reciente, con poblaciones de los clados W1 y W2. Por el este y el sudeste, sin embargo, su expansión se vería frenada por la interrupción del tipo de hábitat “occidental” al que se habrían adaptado sus poblaciones, lo que viene apoyado por el hecho de que algunas de sus respuestas ecológicas, y en particular el patrón de coloración dorsal relacionado con la cripsis (Capítulo 6), se parecen más a las lagartijas occidentales que al clado E2. Nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de utilizar distintos marcadores para comprender la historia evolutiva y situación actual de las especies, así como la importancia del hábitat como modulador del contacto secundario y convergencia fenotípica entre poblaciones de distintos filogrupos que se han adaptado a ambientes similares (W2 y E3), o de la divergencia entre clados del mismo filogrupo (E2 y E3) adaptados a hábitats distintos.

Introducción

La filogeografía trata de identificar los procesos históricos responsables de la distribución actual de los taxones analizando la estructura espacial de las genealogías obtenidas a partir de secuencias genéticas, sobre todo mitocondriales (Avice 2000). Probablemente, su contribución más conocida consista en facilitar la ubicación de las áreas en las que residieron las especies durante (y entre) los períodos fríos del Cuaternario, denominadas habitualmente “refugios glaciares”. En Europa, dichos refugios estuvieron localizados en las penínsulas meridionales del continente, en particular la Ibérica, la Balcánica y, en menor medida, la Itálica. En efecto, desde los trabajos pioneros de Hewitt (1996, 1999), numerosos estudios han documentado la colonización del NO de Europa a partir de refugios localizados en la Península Ibérica para una amplia variedad de taxones que incluyen, por citar sólo algunos ejemplos, mamíferos como el corzo *Capreolus capreolus* (Vernesi et al. 2002), el ratón de campo *Apodemus sylvaticus* (Michaux et al. 1998, 2003) o el topillo agreste *Microtus agrestis* (Jaarola y Searle 2002), aves como el pinzón *Fringilla coelebs* (Griswold y Baker 2002), reptiles como el galápago europeo *Emys orbicularis* (Lenk et al. 1999), anfibios como el sapo corredor *Bufo calamita* (Beebee y Rowe 2000), y plantas como la hiedra *Hedera* ssp. (Grivet y Petit 2002), los robles (especies caducifolias del género *Quercus*, que por su propensión a hibridar han sido estudiadas como un único conjunto: *Quercus pyrenaica* Willd., *Q. faginea* Lam., *Q. canariensis* Willd., *Q. robur* L., *Q. petraea* [Matt.] Liebl., y *Q. pubescens* Willd.; véanse Olalde et al. 2002, Petit et al. 2002a y 2002b) o la encina *Quercus ilex* L./*Q. rotundifolia* Lam. (Lumaret et al. 2002).

No obstante, la Península Ibérica no se ha limitado a servir de refugio meridional a numerosas especies durante los eventos glaciares del Cuaternario, sino que ha protagonizado un papel mucho más complejo, promoviendo elevados niveles de diferenciación intraespecífica, un fenómeno que puede verse reflejado en la estructura filogeográfica de numerosos taxones actuales de distribución parcial o exclusivamente ibérica (Alexandrino et al. 2002, 2007, Godinho et al. 2008, Miraldo et al. 2011). En particular, ciertas características de la Península han facilitado la presencia de un escenario heterogéneo en cuanto a la diversidad de hábitats disponibles durante las épocas glaciares, lo cual habría favorecido el aislamiento de las poblaciones durante las sucesivas contracciones y expansiones geográficas a lo largo del Cuaternario. Entre tales características cabe destacar la presencia de varias cadenas montañosas con una

orientación este-oeste que potencia al máximo el abanico de microclimas disponibles, permitiendo la supervivencia de las poblaciones mediante desplazamientos altitudinales que permitirían rastrear las condiciones más favorables a medida que el clima se hace más frío o más cálido (Hewitt 1996). Esta alternancia de valles y sierras, junto con su ubicación geográfica entre África y Europa y la consecuente variedad climática, con claras influencias mediterránea y atlántica y climas que van de subdesérticos a alpinos, hacen de la Península un enclave idóneo para la proliferación de numerosos refugios glaciares, aislados unos de otros, que habrían dado lugar a procesos de diferenciación alopátrida en numerosas especies vegetales y animales. De hecho, en su revisión de 2007 Gómez y Lunt no encuentran ningún ejemplo de un muestreo detallado a escala peninsular que haya puesto de manifiesto la existencia de un único refugio, lo que les lleva a sugerir que la presencia de múltiples refugios es un fenómeno generalizado que refleja episodios de vicarianza similares, y se traduce en patrones filogeográficos concordantes, para numerosos taxones de la flora y fauna ibéricas (Lumaret et al. 2002, Petit et al. 2002a y 2002b, García-París et al. 2003, Martínez-Solano 2004, Martínez-Solano et al. 2004).

Por otra parte, estos procesos de diferenciación en refugios distintos han debido producirse de forma particularmente intensa en aquellos taxones cuya escasa capacidad de dispersión o cuya estricta dependencia de ambientes favorables hayan podido favorecer su aislamiento geográfico, restringiendo el flujo génico entre poblaciones (Gómez y Lunt 2007). En este sentido, los reptiles terrestres constituyen un grupo idóneo para los estudios filogeográficos, debido a que combinan una escasa capacidad de dispersión con una estrecha dependencia de las condiciones ambientales, ya que, en su condición de ectotermos (Pough 1980), suelen asociarse a los climas más cálidos y secos, y no pueden vivir bajo condiciones en las que la termorregulación está seriamente comprometida. Así, durante el avance de los glaciares su distribución debió quedar relegada a los extremos meridionales de las penínsulas, convirtiendo a éstas en auténticos reservorios de diversidad y endemidad (Arnold y Burton 2007).

Sin embargo, hasta hace no mucho la mayoría de los estudios filogeográficos sobre reptiles ibéricos se han centrado en especies con una distribución disyunta en el oeste y noroeste y en los sistemas montañosos del centro de la Península (Paulo et al. 2001, Godinho et al. 2006a, 2006b, 2008, Pinho et al. 2007a), tal vez por la ventaja que supone trabajar con modelos en los que las poblaciones a comparar presentan

distribuciones alopátridas. Sólo recientemente han comenzado a aparecer trabajos en los que se aborda el estudio de especies de distribución amplia en la región mediterránea de la Península (Carranza et al. 2006, Fitze et al. 2011, Miraldo et al. 2011), a pesar de que son éstas las que deberían presentar, en virtud precisamente de su adaptación al clima mediterráneo (Díaz et al. 1996), patrones filogeográficos más complejos en respuesta a las vicisitudes climáticas del Pleistoceno.

A este respecto, es llamativo el caso de la lagartija colilarga *Psammodromus algirus*, probablemente la especie de lacértido más común y ampliamente difundida en la Península Ibérica fuera de las ambientes fuertemente antropizados en los que dominan las especies del género *Podarcis*. En 2006, Carranza y colaboradores realizaron un estudio filogeográfico en el que ponían de manifiesto la existencia de dos linajes de ADN mitocondrial en esta especie, uno occidental y otro oriental, separados desde hace 3.6 millones de años; al mismo tiempo, tal y como se ha comentado en el Capítulo 2, Busack y Lawson (2006) encontraron diferencias en el ADN mitocondrial y las aloenzimas de poblaciones ibéricas del centro y del sur peninsular, lo que, en combinación con análisis morfológicos posteriores, dió pie a que Busack et al. (2006) describieran como nuevas especies *P. manuelae* de Manzanares el Real (Madrid) y *P. jeanneae* de las proximidades de Facinas (Cádiz; véase el Capítulo 2). Sin embargo, y en base a los resultados expuestos en Verdú-Ricoy et al. (2010), que se reproducen en el Capítulo 2, la lista patrón revisada por la Asociación Herpetológica Española en 2011 (Carretero et al. 2011) concluye que “ambos taxa corresponden respectivamente a los subclados norte y sur del linaje oeste del taxón con un bajo nivel de diferenciación genética”, por lo que “recomiendan sinonimizar ambos binomios con *P. algirus*. Persiste, no obstante, la indefinición del estatus del bien diferenciado clado este que queda innominado”. Si además se tiene en cuenta que la diferenciación de los dos linajes mitocondriales encuentra eco en las diferencias fenotípicas, relacionadas con las estrategias reproductivas, que se han revisado en los Capítulos 3 y 4, parece oportuno profundizar en la filogeografía de las poblaciones ibéricas de *P. algirus* con vistas a:

- Terminar de definir la estructura filogeográfica de la especie, estableciendo de forma precisa cuáles son sus principales filogrupos y, en la medida de lo posible, cuál es su distribución en la Península Ibérica.
- Combinar marcadores mitocondriales de herencia materna y evolución lenta con

marcadores nucleares de herencia biparental y evolución rápida (microsatélites); los primeros son más útiles para establecer la estructura filogeográfica del apartado anterior, mientras que los segundos sirven para estimar el nivel de flujo génico reciente entre poblaciones o filogrupos.

- Detectar posibles zonas de contacto entre filogrupos para tratar de establecer la situación evolutiva de las poblaciones asentadas en dichas zonas: aislamiento, diferenciación incipiente o mezcla estable. Para ello, estudiaremos si hay o no concordancia entre los patrones definidos por el ADN mitocondrial y los patrones de flujo deducidos de los microsatélites. Además, trataremos de arrojar luz sobre los procesos ecológicos que podrían explicar el origen y mantenimiento de dichas zonas de contacto.

Material y métodos

Zonas de muestreo

Las muestras de tejido de *Psammodromus algirus* se obtuvieron durante los periodos de actividad (primavera y verano) de 2002, 2006, 2008, 2009 y 2010 de un total de 36 localidades repartidas a lo largo del área de distribución ibérica de la especie (Figura 5.1 y Tabla 5.1). El muestreo se concentró en la zona central de la Península Ibérica con el objetivo de delimitar de forma precisa las respectivas áreas de distribución de los principales filogrupos que conforman *P. algirus* en la Península (un linaje oriental con tres clados y otro occidental con dos; Verdú-Ricoy et al. 2010, Capítulo 2 y Resultados). El esfuerzo de captura se intensificó en nueve poblaciones (hasta alcanzar $N \geq 25$) para los posteriores análisis con microsatélites. Este subconjunto de localidades se escogió tratando de maximizar la cobertura geográfica y la representación de todos los clados mitocondriales. Todas las lagartijas fueron capturadas con lazo, tras lo cual se les cortó la porción distal de la cola (~ 2 cm) para posteriores extracciones de ADN, siendo liberadas en el mismo lugar de captura inmediatamente después.

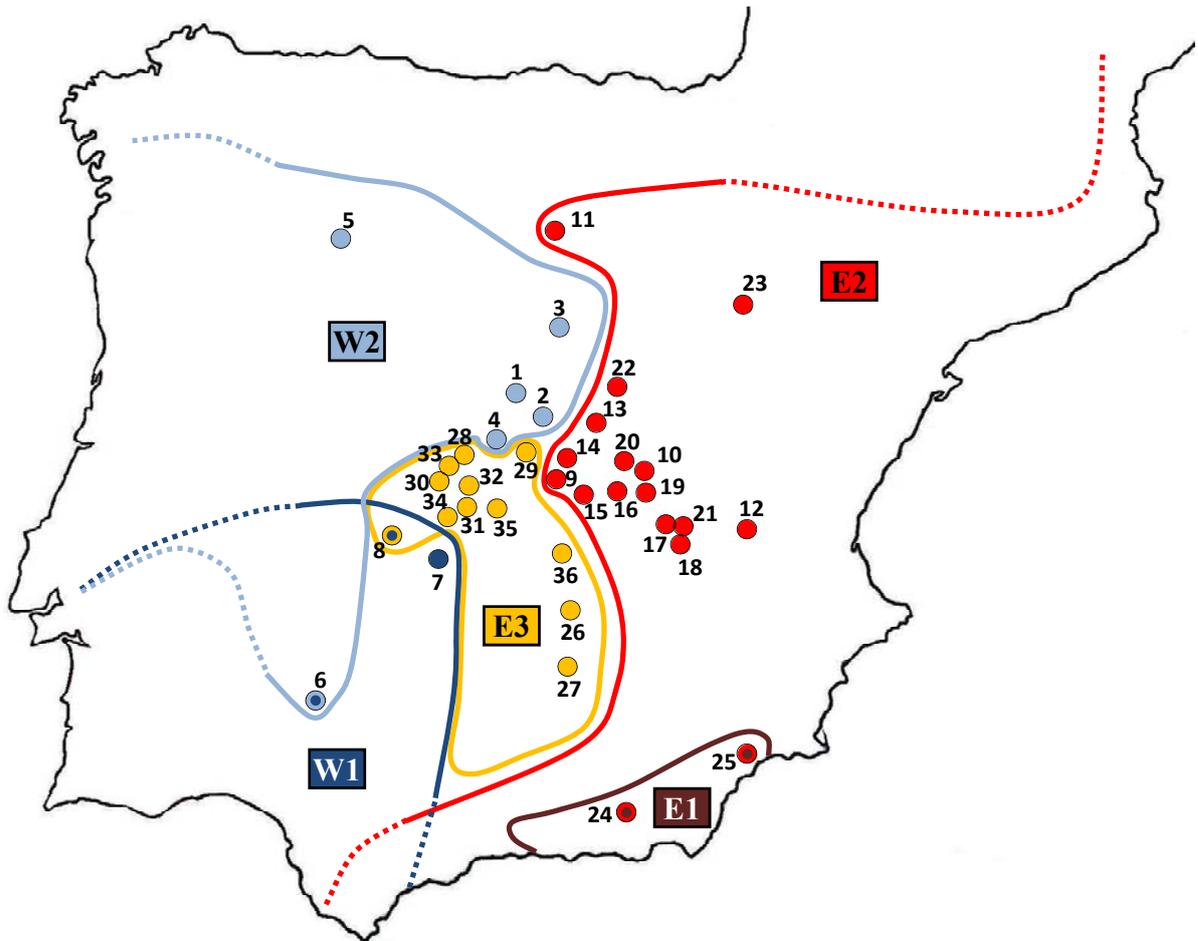


Figura 5.1. Poblaciones de *P. algirus* empleadas en este estudio. Los números corresponden a las localidades de la Tabla 5.1. Los colores representan los cinco filogrupos principales mostrados en la red de haplotipos de la Figura 5.2 y sus áreas de distribución hipotéticas. Las poblaciones con dos colores representan localidades en las que se han encontrado haplotipos de diferentes grupos, ya sean del mismo linaje (poblaciones 6, 24 y 25) o de los dos linajes mitocondriales (población 8).

Extracción de ADN y amplificaciones por PCR

El ADN se extrajo a partir de aproximadamente 40 mg de tejido empleando el Kit BioSprint 15 DNA® de Qiagen y siguiendo el protocolo del fabricante. La calidad y eficiencia de las extracciones se inspeccionó visualmente mediante electroforesis y con procedimientos analíticos como la cuantificación de la concentración de ADN y del cociente A_{260}/A_{280} (indicador de la pureza de la extracción) mediante un espectrofotómetro NanoDrop.

Nº	Población	Latitud (° N)	Longitud (° E)	N	Códigos de haplotipos	Clado(s)	N _H	N _{EXC}	H _D	π
1*	Navacerrada	40,726	-4,023	9	1-3	W2	3	2	0,417	0,44
2*	El Pardo	40,511	-3,755	9	1, 4-5	W2	3	2	0,556	1,39
3	Sotos de Sepúlveda	41,267	-3,567	8	1, 6-7	W2	3	2	0,714	0,86
4	Aldea del Fresno	40,330	-4,244	8	1	W2	1	0	0	0
5*	Cabañas de Tera	42,011	-6,056	13	1, 8	W2	2	1	0,154	0,15
6*	Pallarés	38,057	-6,184	12	9-16	W1+W2	8	7	0,924	6,18
7	Helechosa de los Montes	39,314	-4,900	5	11	W1	1	0	0	0
8*	Villuercas	39,468	-5,341	16	11, 42	W1+E3	2	0	0,525	24,68
9*	Aranjuez	40,016	-3,586	8	17-18	E2	2	1	0,250	0,25
10	Torrejoncillo del Rey	40,035	-2,599	9	18	E2	1	0	0	0
11	Lerma	42,134	-3,650	30	18-20	E2	3	2	0,628	1,23
12*	Hoces del Cabriel	39,542	-1,518	15	18, 21-24	E2	5	3	0,562	0,65
13	Pioz	40,443	-3,161	7	18, 25	E2	2	1	0,286	0,29
14	San Martín de la Vega	40,187	-3,544	7	18	E2	1	0	0	0
15	Villatobas	39,839	-3,259	5	18	E2	1	0	0	0
16	Saelices	39,873	-2,788	4	18	E2	1	0	0	0
17	Villar de la Encina	39,627	-2,492	2	18, 26	E2	2	1	1	1,00
18	Vara de Rey	39,422	-2,320	4	18	E2	1	0	0	0
19	Villares del Saz	39,856	-2,541	8	18, 27	E2	2	1	0,250	0,25
20	Vellisca	40,139	-2,813	6	18, 28	E2	2	1	0,333	0,33
21	Honrubia	39,586	-2,220	4	18, 24	E2	2	0	0,500	0,50
22	Brihuega	40,766	-2,930	10	18	E2	1	0	0	0
23	El Frasno	41,421	-1,489	12	18	E2	1	0	0	0
24*	Abrucena	37,119	-2,812	13	29-31	E1+E2	3	3	0,641	10,77
25	Morata	37,588	-1,555	9	18, 32-34	E1+E2	4	3	0,750	14,33
26	Valdepeñas	38,901	-3,477	10	35-38	E3	4	4	0,733	1,64
27	Despeñaperros	38,375	-3,519	7	39-42	E3	4	3	0,714	2,19
28*	Pelahustán	40,180	-4,607	10	42-43	E3	2	1	0,200	0,40
29	Monte de Batres	40,224	-3,938	11	42, 44-45	E3	3	2	0,564	0,62
30	Talavera de la Reina	39,936	-4,820	7	42, 46-49	E3	5	4	0,857	1,62
31	Villarejo de Montalbán	39,760	-4,568	11	42, 50-52	E3	4	2	0,691	0,95
32	Malpica de Tajo	39,912	-4,545	8	42, 50, 53-54	E3	4	2	0,750	1,89
33	San Román de los Montes	40,084	-4,730	3	42, 55-56	E3	3	2	1	2,00
34	Espinoso del Rey	39,652	-4,788	3	42	E3	1	0	0	0
35	Noez	39,747	-4,197	10	42, 57-58	E3	3	2	0,644	0,73
36	Puerto Lápice	39,328	-3,490	5	59-60	E3	2	2	0,600	1,20

Tabla 5.1. Información geográfica y diversidad del ADN mitocondrial en las 36 localidades muestreadas. Para cada población, con el mismo código numérico de la Figura 5.1 en la primera columna, se indica la latitud, la longitud, el tamaño de muestra (N), la identidad de los haplotipos obtenidos y el (o los) clado(s) al (o a los) que pertenecen según los códigos de la Figura 5.2, el número de haplotipos (N_H) el número de haplotipos exclusivos (N_{EXC}) y los valores de diversidad haplotípica (H_D) y diversidad nucleotídica (π , expresada como número medio de mutaciones puntuales entre las secuencias). Las poblaciones para las que se dispone además de información sobre siete loci de microsatélites aparecen señaladas con un asterisco.

Un fragmento de 849 pb que incluye los genes mitocondriales de la cuarta subunidad de la NADH deshidrogenasa (ND4) y los tres ARNt adyacentes (histidina, serina y leucina) fue amplificado usando los *primers* ND4 y Leu (Arévalo et al. 1994). Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen total de 50 μ l con 1x buffer de reacción, 2 mM MgCl₂, 0.4 μ M de cada primer, 0.2 mM de cada dNTP, 1.25 U de DNA

polimerasa Go-Taq Flexi (Promega), y 3 µl del ADN previamente extraído (50-100 ng). Las condiciones de PCR consistieron en un paso previo de desnaturalización de 3 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, ligamiento de *primers* durante 30 segundos a 54 °C y elongación durante 40 segundos a 72 °C, con un paso final de elongación de 4 minutos a 72 °C. La efectividad de las PCR se comprobó visualmente por la migración de los productos de PCR en geles de agarosa. Los productos de PCR fueron purificados mediante un proceso de limpieza con acetato de amonio y etanol y secuenciados mediante el protocolo de secuenciación ABI Prism Big Dye Terminator Cycle en un secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron alineadas con CLUSTALX (Thompson et al. 1997) bajo los parámetros por defecto del programa (penalización por apertura de gap = 10; penalización por extensión de gap = 0.2) y visualmente inspeccionadas con BIOEDIT v.7.0.5 (Hall 2005).

Siete loci de microsatélites descritos de forma específica para *Psammodromus algirus* (Psal1, Psal2, Psal3, Psal4, Psal5, Psal7 and Psal8; Bloor y Dávila 2008) fueron amplificados para nueve poblaciones (Abrucena, Hoces del Cabriel, Aranjuez, Pelahustán, Villuercas, Pallarés, El Pardo, Navacerrada y Cabañas de Tera) usando los *primers* y el protocolo establecido por los autores. Las amplificaciones múltiples se realizaron en un volumen total de 25 µL con 1x buffer de reacción, 2 mm MgCl₂, 0.2 mm de cada dNTP y 0.75 U de Taq Polimerasa, con 0.2-0.5 µM de cada *primer* (véase Bloor y Dávila 2008). Las condiciones de PCR consistieron en un paso previo de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización durante 45 segundos a 94 °C, ligamiento de *primers* durante 45 segundos a 52 °C y elongación durante 45 segundos a 72 °C, con un paso final de elongación de 30 minutos a 60 °C. El genotipado de las muestras fue realizado por Source BioScience (Nottingham) y el análisis del mismo se llevó a cabo mediante el programa PEAK SCANNER v.1.0 (Applied Biosystems). Debido a que la mayoría de los programas enfocados al estudio de microsatélites requieren la información alélica expresada en número de repeticiones del motivo, y no en tamaños de los productos amplificados (en pb, tal y como refleja el análisis del genotipado), se procedió a la secuenciación de los fragmentos amplificados de 2-3 homocigotos para cada loci, con el fin de realizar la correspondencia entre el tamaño de los fragmentos (pb) y el número de repeticiones del motivo (tetranucleótidos en todos los loci).

Análisis de los datos genéticos

ADN mitocondrial.- Las relaciones filogenéticas de las secuencias mitocondriales se reconstruyeron con TCS v.1.21 (Clement et al. 2000), que elabora redes de haplotipos empleando el criterio de parsimonia (Templeton et al. 1992). Este método de inferencia filogenética contiene información no reflejada en los árboles filogenéticos que puede ser útil a la hora de inferir la historia demográfica de las poblaciones (Zachos 2009). Las estimas de diversidad haplotípica (H_D) y diversidad nucleotídica (π) fueron obtenidas con DNASP v.5 (Librado y Rozas 2009) para todas las poblaciones muestreadas. Además, se elaboraron varios subconjuntos de haplotipos, agrupándolos en función de los distintos grupos obtenidos (linajes y clados: dos linajes, occidental y oriental, con dos y tres clados respectivamente), para calcular el número medio de cambios (mutaciones) y estimar los porcentajes de divergencia entre ellos. Asimismo, para cada uno de los cinco clados se obtuvieron histogramas de frecuencias para el número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (*mismatch distribution*) que se compararon mediante chi-cuadrados de máxima verosimilitud con las frecuencias esperadas bajo dos supuestos distintos: 1) un modelo de evolución neutral y de tamaño de población constante (Watterson 1975, Slatkin y Hudson 1991), y 2) un modelo de expansión demográfica a partir de una subpoblación de tamaño reducido (Rogers y Harpending 1992). Este segundo modelo se basa en dos parámetros mutacionales: *Theta* ($\theta = 2N_e\mu$, donde N_e es el tamaño efectivo de la población de hembras y μ es la tasa de mutación por secuencia y generación) y *Tau* ($\tau = 2\mu t$, donde t es el tiempo en generaciones y μ es la tasa de mutación por secuencia y generación, Rogers y Harpending 1992). Generalmente los valores de θ_i (antes de la expansión) y τ son desconocidos, pero se pueden estimar a partir de los datos mediante la aproximación de θ_f (después de la expansión) a infinito (Rogers 1995). En nuestro caso, los valores de θ_i y τ se obtuvieron asumiendo que $\theta_f = 1.000$. Las estimas de estos parámetros se usaron después para obtener los valores esperados bajo el supuesto de expansión demográfica. Por otra parte, y dada la tendencia conservadora de la mayoría de los parámetros basados en distribuciones *mismatch*, se optó también por incluir en este estudio las estimas de R_2 (Ramos-Onsins y Rozas 2002), un estadístico más potente en la detección de expansiones poblacionales (véase Pinho et al. 2007a y Miraldo et al. 2011). El valor de R_2 ilustra la diferencia entre el número de mutaciones de tipo *singleton* (es decir, instancias únicas) y el número medio de cambios entre pares de

secuencias (Ramos-Onsins y Rozas 2002). Así, eventos de expansión reciente producen valores bajos de este estadístico. En nuestro caso, se estimó el valor de R_2 para cada uno de los cinco clados y su significación estadística tras 1.000 simulaciones coalescentes.

Las distancias genéticas entre las poblaciones (F_{ST} estimadas en base al número de *pairwise differences* entre ellas) y su significación estadística tras 10.000 permutaciones fueron calculadas con ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier et al. 2005), aplicando la corrección secuencial de Bonferroni. Para investigar el reparto de la variabilidad genética entre linajes, se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA). Debido al carácter “híbrido” de Villuerca (que posee haplotipos de ambos linajes, véanse la Figura 5.1 y la Tabla 5.1), se excluyó esta población de los AMOVAs entre linajes.

Microsatélites.- Los datos de microsatélites de las poblaciones genotipadas fueron analizados en primer lugar con ARLEQUIN para estimar los valores de heterocigosidad observada y esperada para cada loci y población, realizando los test correspondientes para detectar posibles desviaciones con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, así como posibles desequilibrios de ligamiento. Las distancias genéticas entre las poblaciones se calcularon empleando los estadísticos F_{ST} (Wright 1951) y R_{ST} (Slatkin 1995), estimándose su significación tras realizar 10.000 permutaciones. R_{ST} es un análogo de F_{ST} que, en vez de considerar sólo las frecuencias de los distintos alelos, tiene en cuenta las diferencias en el número de repeticiones, asumiendo un modelo de mutación por pasos supuestamente capaz de reflejar con más exactitud el patrón de evolución de los microsatélites; estudios previos sugieren que R_{ST} y F_{ST} son similares cuando la diferenciación es escasa, mientras que R_{ST} supera a F_{ST} cuando el nivel de diferenciación es importante (Lugon-Moulin et al. 1999, Hardy et al. 2003). En todos los casos (Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento y distancias genéticas) la significación estadística se examinó tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni.

Los datos de alelos de microsatélites se analizaron seguidamente con STRUCTURE v.2.3 (Pritchard et al. 2000) para comprobar la existencia de estructura poblacional en base a marcadores nucleares. Para todo el conjunto de datos se estimó el número más probable de poblaciones ancestrales o *clusters* (K) entre un mínimo de 1 y un máximo de 9, con 3 réplicas independientes para cada valor de K. Se empleó el

modelo de mezcla entre *clusters* y de frecuencias correlacionadas (Falush et al. 2003), con un total de 1.000.000 de pasos de la cadena de Markov tras descartar los primeros 200.000. Dado que nuestras poblaciones demostraron ser informativas acerca de la ancestría (como se pudo deducir en base a los valores de r próximos a 0; véanse los detalles en la documentación de STRUCTURE), dicha información previa fue empleada para ayudar a la agrupación de las diferentes poblaciones en los distintos *clusters* genéticos (opción *Locprior* del programa; Hubisz et al. 2009).

Por último, en los AMOVA con microsatélites se usaron dos criterios de agrupación distintos:

- En base al linaje mitocondrial (de la misma forma que antes, excluyendo la población de Villuercas dado su carácter “híbrido”).
- En base a los *clusters* obtenidos con STRUCTURE (asociando cada población al *cluster* con mayor probabilidad de asignación). Aunque este segundo planteamiento es en buena medida circular, se empleó para disponer de una referencia con la que comparar los estadísticos de fijación y porcentajes de variación obtenidos en el punto anterior.

Asimismo, y para corroborar el mayor o menor grado de mezcla de clados y/o linajes mitocondriales en los grupos definidos por los microsatélites, se llevó a cabo un AMOVA con las secuencias mitocondriales clasificadas en función de los *clusters* obtenidos con STRUCTURE.

Para todas las agrupaciones realizadas, la estructura genética entre poblaciones se describió utilizando F_{ST} y R_{ST} como índices de diferenciación. Dado que ambos estimadores presentan ventajas e inconvenientes, relacionadas con el balance entre mutación, migración y deriva que caracteriza a cada caso particular (Balloux y Lougon-Moulin 2002, Hardy et al. 2003), en la actualidad se recomienda el uso, comparación crítica e interpretación cuidadosa de ambos índices (Balloux y Lougon-Moulin 2002).

ADN mitocondrial y microsatélites.- Finalmente, los datos mitocondriales y nucleares se combinaron en IMA2 (Hey 2010), un programa que realiza estimaciones simultáneas de parámetros poblacionales mediante simulaciones de Markov basadas en la teoría de la coalescencia. En nuestro estudio, los análisis de IMA2 se realizaron con el

objetivo de estimar los niveles de flujo génico entre las poblaciones en base a los valores del parámetro m , que es la tasa de migración ajustada por la tasa de mutación ($m = M/u$, en donde M es la tasa de mutación por gen y por generación, y u es la tasa de mutación neutral por generación, Hey 2010). El valor de m representa así la tasa de flujo génico que mantiene una población con cada una de las restantes poblaciones con las que coexiste en el tiempo. Los análisis se llevaron a cabo bajo los modelos de evolución HKY para las secuencias de ADN mitocondrial y SMM para los alelos de microsatélites. Las simulaciones de IMA2 requieren un árbol filogenético previo de las poblaciones a analizar, lo que implica la designación de determinadas poblaciones ancestrales en aquellos análisis con más de dos poblaciones a analizar. Puesto que solo disponemos de la información filogenética de las secuencias (no de las poblaciones, que pueden albergar haplotipos más o menos divergentes, como de hecho ocurre en algunas localidades de este estudio, véase la Tabla 5.1) y que además dichas filogenias están basadas solamente en las diferencias en el ADN mitocondrial (ya que no disponemos de filogenias en base a secuencias nucleares), decidimos llevar a cabo análisis comparando las poblaciones dos a dos. Esta opción, que era la que inicialmente empleaba IMA (Hey y Nielsen 2007), permite utilizar el árbol filogenético más simple posible, en el que se asume que las dos poblaciones a analizar provienen de otra población ancestral (desconocida, panmíctica y más o menos alejada en el tiempo) evitando así asignar el carácter ancestral a ninguna de ellas. No obstante, comparar dos a dos un conjunto de nueve poblaciones supone un total de 36 análisis distintos, además de varias réplicas de cada uno de ellos para comprobar la convergencia en sus resultados. Dado que cada análisis individual con microsatélites requiere un notable esfuerzo de computación, que puede emplear semanas e incluso meses en terminar (véase la documentación de IMA2), realizar varias réplicas de cada uno de los 36 análisis resulta poco viable. Por ello, y dado que los análisis preliminares arrojaron resultados coherentes con los obtenidos con STRUCTURE (por ejemplo la ausencia de flujo entre la población de Cabañas y el resto de localidades; véanse los resultados), en nuestro estudio optamos por no incluir réplicas independientes para todos y cada uno de los análisis. En su lugar, repetimos los análisis para un conjunto reducido de pares de poblaciones y estimamos la repetibilidad de las correspondientes estimas, con objeto de valorar hasta qué punto son fiables los resultados basados en una sola réplica. Tras varios análisis preliminares para la optimización de los ajustes, las simulaciones usaron 40 cadenas de Markov con una duración de 5.000.000 de pasos tras descartar los primeros 100.000. La tasa de mutación

empleada para las secuencias mitocondriales se calculó en base al número medio de mutaciones entre los dos linajes (estimada previamente con DNASP) y el tiempo de divergencia entre los mismos, de 3.6 Ma (Carranza et al. 2006).

Resultados

Estructura genética en base al ADN mitocondrial

La secuenciación de los 318 fragmentos mitocondriales produjo 60 haplotipos distintos, agrupados en cinco clados dentro de los dos linajes principales (Tabla 5.1, Figura 5.2). Este resultado, que se corresponde con los árboles filogenéticos de Verdú-Ricoy et al. (2010, Capítulo 2), divide al linaje occidental en dos grupos situados al SO y NO de la Península Ibérica (W1 y W2, respectivamente). El linaje oriental, por su parte, se compone de tres clados principales: un grupo restringido al SE (E1), otro ocupando casi toda la mitad oriental (E2) y un tercer grupo en el centro de la Península (E3) con una distribución alopátrida respecto al anterior. El porcentaje de divergencia entre los dos linajes, calculado en base al número medio de diferencias nucleotídicas entre sus haplotipos, fue del 5.73%. Dentro de cada linaje, el grado de diferenciación entre los distintos clados fue mayor para el linaje oriental, con porcentajes de 2.97, 3.28 y 2.47% de divergencia (para las comparaciones entre E1-E2, E1-E3 y E2-E3, respectivamente) frente a un 1.71% de divergencia entre los dos grupos occidentales (W1 frente a W2).

La relación entre los distintos haplotipos de cada grupo produjo dos tipologías diferentes. Por un lado, los haplotipos de los clados con distribución más meridional (W1 y E1) se agruparon en estructuras lineales, sin patrones definidos y sin ser ninguno de ellos claramente predominante. Por el contrario, los grupos W2, E2 y E3 presentaron redes de haplotipos con tipologías en forma de estrella, en las que la mayoría de las mutaciones se producen sobre un haplotipo predominante a partir del cual se generan los demás (Figura 5.2). Estos resultados se vieron corroborados, al menos parcialmente, por los análisis de *mismatch distribution* (Figura 5.3); aunque los clados E1 y E2 no se ajustaron a ninguno de los modelos demográficos planteados (evolución neutral y tamaño de población constante, o expansión demográfica a partir de una subpoblación de

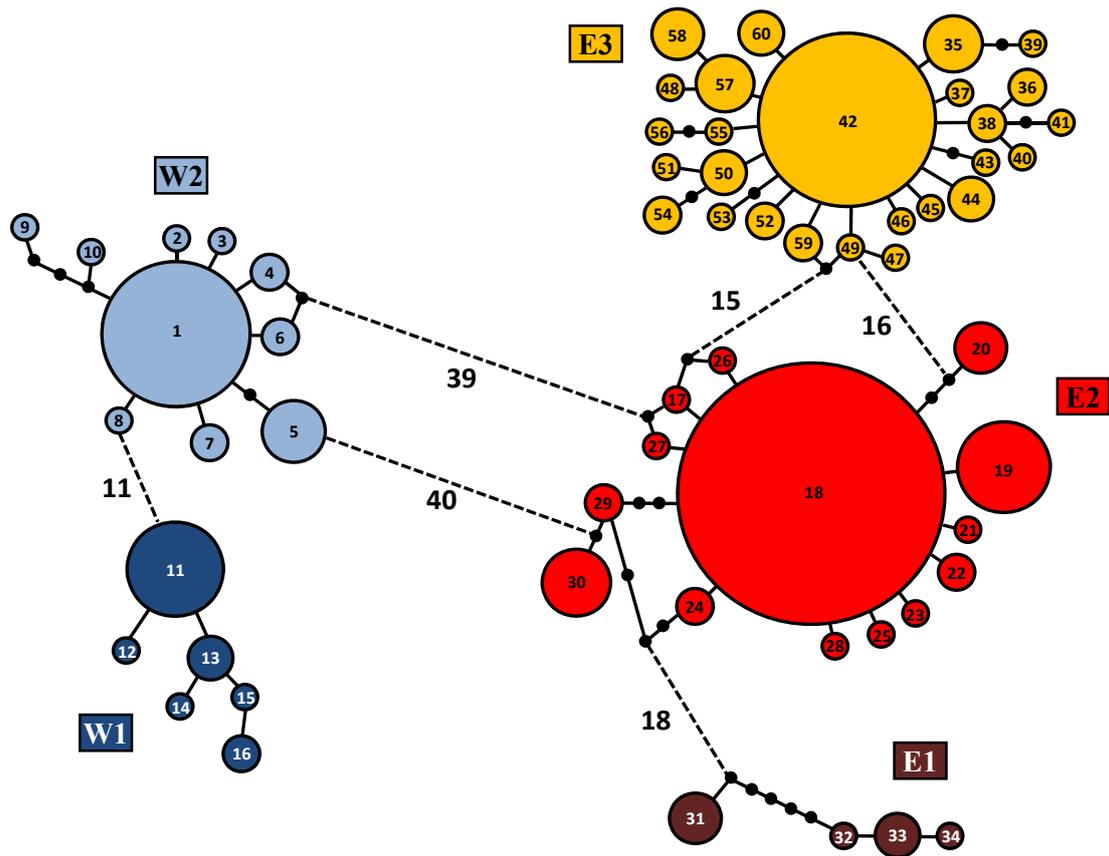
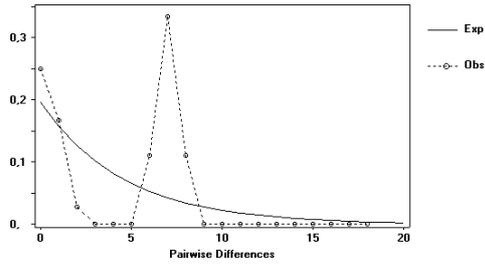


Figura 5.2. Red de haplotipos obtenida a partir de 318 secuencias de un fragmento de ADN mitocondrial de 849 pb de *P. algirus*. Cada círculo coloreado y numerado representa un haplotipo distinto encontrado en los muestreos. Los números de los círculos se refieren a los códigos que aparecen en la Tabla 5.1, su área es proporcional al número de individuos con cada haplotipo, y el color hace referencia a los filogrupos de la Figura 5.1. Los círculos negros representan haplotipos intermedios no encontrados. Las líneas negras continuas representan cambios de una sola base entre dos haplotipos, y las discontinuas una cantidad mayor de cambios (indicada mediante números).

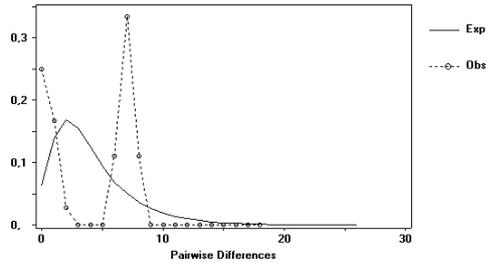
tamaño reducido; $P \leq 0.005$ en todos los casos), y W1 y W2 no difirieron significativamente de ninguno de ellos ($P > 0.4$ en todos los casos), el clado E3 se ajustó mucho mejor al modelo de expansión demográfica ($P = 0.997$) que al de tamaño de población constante ($P < 0.001$; véase la Figura 5.3).

Por otra parte, las estimas de R_2 se ajustaron de forma más clara a las topologías observadas en la red de haplotipos. Así, los clados W2, E2 y E3 presentaron valores bajos, y significativos, de R_2 (W2: $R_2 = 0.048$, $P = 0.017$; E2: $R_2 = 0.028$, $P = 0.006$; E3: $R_2 = 0.024$, $P < 0.001$), indicando un número de *singletons* (es decir, cambios presentes en una sola secuencia) mayor del esperado en una población de tamaño constante, y más típico, por el contrario, de una población en la que el crecimiento rápido genera una acumulación de mutaciones recientes en las ramas externas de la genealogía (es decir, en

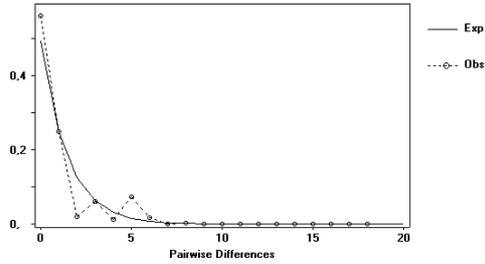
E1, población constante: $G_5 = 16.69$, $P = 0.005$



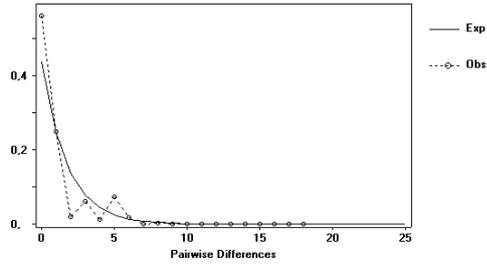
E1, expansión demográfica: $G_5 = 20.25$, $P = 0.001$



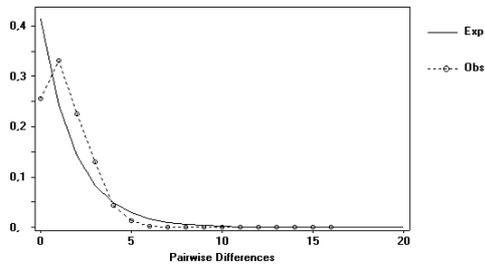
E2, población constante: $G_7 = 40.90$, $P < 0.001$



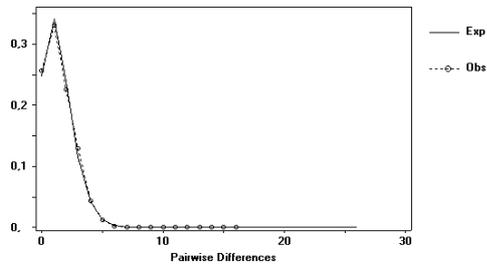
E2, expansión demográfica: $G_7 = 44.82$, $P < 0.001$



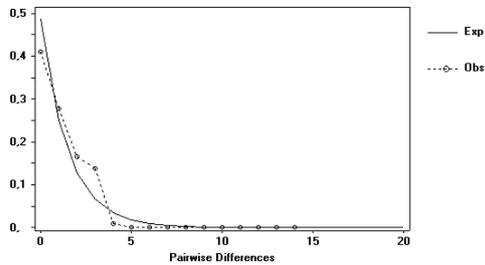
E3, población constante: $G_6 = 22.72$, $P < 0.001$



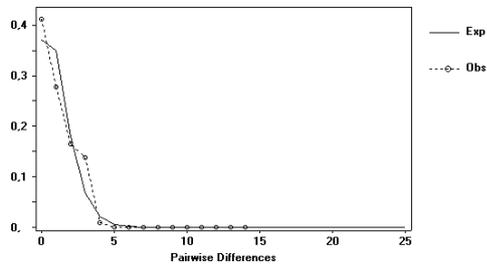
E3, expansión demográfica: $G_6 = 0.55$, $P = 0.997$



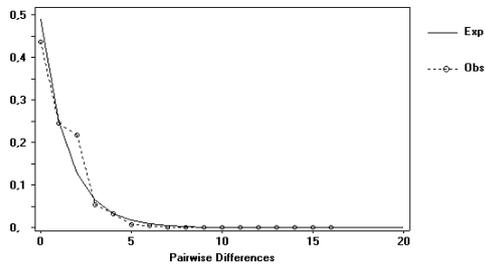
W1, población constante: $G_4 = 4.03$, $P = 0.401$



W1, expansión demográfica: $G_4 = 2.34$, $P = 0.673$



W2, población constante: $G_6 = 4.30$, $P = 0.636$



W2, expansión demográfica: $G_6 = 2.63$, $P = 0.854$

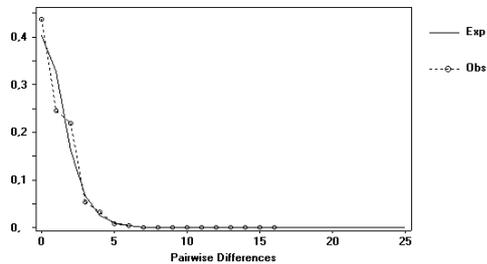


Figura 5.3. Gráficas de *mismatch distribution* para los cinco clados de *P. algirus* representados en la Figura 5.2. El eje horizontal representa el número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias, y el eje vertical muestra la proporción relativa a todas las comparaciones posibles. Las líneas continuas representan los valores esperados bajo un modelo de tamaño de población constante (izquierda) o de expansión demográfica (derecha) y las discontinuas unen los valores obtenidos con los datos.

los extremos de la red de haplotipos; véase Ramos-Onsins y Rozas 2002). Sin embargo, los clados E1 y W1 no mostraron un patrón significativamente distinto del esperado en una población sin cambios demográficos sustanciales ni rápidas ampliaciones de su área de distribución (E1: $R_2 = 0.246$, $P = 0.943$; W1: $R_2 = 0.105$, $P = 0.220$).

Al correlacionar las estimas de diversidad genética con la latitud de las poblaciones muestreadas (Tabla 5.1) se pudo observar una disminución de sus valores en las localidades más septentrionales, marginalmente no significativa en el caso de la diversidad haplotípica ($r = 0.322$, $N = 36$, $P = 0.0552$), pero significativa para la diversidad nucleotídica ($r = 0.469$, $N = 36$, $P = 0.0039$) y el número de haplotipos únicos ($r = 0.426$, $n = 36$, $P = 0.0096$); es decir, la diversidad genética observada fue mayor en las poblaciones del sur que en las del norte. En la gran mayoría de las poblaciones sólo se encontraron haplotipos de un único clado (Tabla 5.1). Las únicas excepciones, identificables por sus elevadas diversidades nucleotídicas, fueron las localidades de Pallarés (con haplotipos de W1 y W2), Abrucena y Morata (con haplotipos de E1 y E2 en ambos casos) y Villuercas (la única con haplotipos de ambos linajes, de los clados W1 y E3).

Las distancias genéticas mitocondriales entre las nueve poblaciones analizadas (Tabla 5.2 A), en consonancia con los resultados de la red de haplotipos (Figura 5.2), fueron máximas al comparar poblaciones de distintos linajes (E y W). Sin embargo, también se encontraron distancias elevadas entre algunas poblaciones del linaje oriental (Aranjuez y Hoces del Cabriel, del clado E2, frente a Pelahustán, del clado E3). Por el contrario, se encontraron valores inusualmente bajos de F_{ST} para la distancias entre Navacerrada y Cabañas, del linaje occidental, por un lado, y Aranjuez y Hoces del Cabriel, del linaje oriental, por el otro (éstas, de hecho, fueron las únicas comparaciones no significativas, incluso sin aplicar la corrección secuencial de Bonferroni). Los resultados del AMOVA mostraron que, como cabría esperar, las mayores proporciones de variación correspondieron, en orden decreciente, a las diferencias entre linajes ($F_{ST} = 0.772$, $P = 0.029$), a las diferencias entre poblaciones dentro de cada linaje ($F_{ST} = 0.728$, $P < 0.001$) y, por último, a las diferencias dentro de cada población (Tabla 5.3 A).

A) ADN mitocondrial

	Aranjuez	Hoces	Abrucena	Pelahustán	Villuercas	Pallarés	Navacerrada	El Pardo	Cabañas
Aranjuez	-	0.000 ^{ns}	0.378	0.982	0.488	0.913	0.992	0.980	0.996
Hoces		-	0.462	0.972	0.567	0.930	0.987	0.979	0.990
Abrucena			-	0.726	0.427	0.810	0.853	0.840	0.876
Pelahustán				-	0.332	0.928	0.992	0.983	0.995
Villuercas					-	0.445	0.564	0.550	0.607
Pallarés						-	0.693	0.665	0.736
Navacerrada							-	0.484	0.019 ^{ns}
El Pardo								-	0.577
Cabañas									-

B) Microsatélites

	Aranjuez	Hoces	Abrucena	Pelahustán	Villuercas	Pallarés	Navacerrada	El Pardo	Cabañas
Aranjuez	-		0.060	0.028	0.026	0.037	0.037	0.045	0.107
Hoces		-							
Abrucena	0.116		-	0.049	0.037	0.023	0.056	0.042	0.114
Pelahustán	0.298		0.133	-	0.011	0.021	0.024	0.019	0.094
Villuercas	0.122		0.100	0.090	-	0.020	0.010	0.005 ^{ns}	0.081
Pallarés	0.151		0.034 ^{ns}	0.076	0.048	-	0.031	0.029	0.102
Navacerrada	0.059		0.083	0.173	0.012 ^{ns}	0.075	-	0.026	0.077
El Pardo	0.178		0.068	0.052	0.008 ^{ns}	0.030 ^{ns}	0.049 ^{ns}	-	0.112
Cabañas	0.391		0.246	0.414	0.266	0.412	0.230	0.355	-

Tabla 5.2. Distancias genéticas entre nueve poblaciones de *P. algirus*. A) Distancias en base a secuencias de ADN mitocondrial (F_{ST}). B) Distancias calculadas en base a siete loci de microsatélites; por encima de la diagonal se muestran las distancias calculadas con F_{ST} , y por debajo las calculadas con R_{ST} . Los valores señalados con *ns* corresponden a distancias estadísticamente no significativas tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni.

Subestructura poblacional con marcadores nucleares (microsatélites)

Los niveles de diversidad y heterocigosidad de las nueve poblaciones muestreadas para los siete loci analizados aparecen en la Tabla 5.4. En general, los datos de microsatélites cumplieron los requisitos de equilibrio de ligamiento y de Hardy-Weinberg para la mayoría de las poblaciones y loci. La única excepción al equilibrio de ligamiento se halló en Pallarés, en la que los pares de loci Psa11-Psa13, y Psa13-Psa15 estuvieron ligados entre sí (es decir, dos comparaciones significativas de un total de 159 posibles, juntando los datos de todas las poblaciones y todos los loci). Las excepciones al equilibrio de Hardy-Weinberg se encontraron en Navacerrada con Psa11, en El Pardo con Psa13, en Pallarés con Psa15 y en Aranjuez con Psa17 (en total, 4 análisis significativos de 58 posibles).

Agrupación	a) ADN mitocondrial			b) Microsatélites		
1. Basada en linajes mitocondriales	F _{ST}	% Var	P	R _{ST}	% Var	P
Entre linajes	0.772	77.2	0.029	0.000	0.0	0.713
Entre poblaciones de linajes	0.728	16.6	< 0.001	0.178	17.8	< 0.001
Dentro de poblaciones	0.938	6.2		0.164	82.2	
2. Basada en <i>clusters</i> de microsatélites	F _{ST}	% Var	P	R _{ST}	% Var	P
Entre <i>clusters</i>	0.256	25.6	0.124	0.119	11.9	0.001
Entre poblaciones de <i>clusters</i>	0.738	54.9	< 0.001	0.060	5.3	< 0.001
Dentro de poblaciones	0.805	19.5		0.172	82.8	

Tabla 5.3. Resultados de los AMOVAs con a) datos de ADN mitocondrial y b) datos de microsatélites en función de 1) el linaje mitocondrial y la población (excluyendo la población de Villuercas al no poder asignarse a ninguno de los dos linajes dado su carácter “híbrido”) y 2) los *clusters* obtenidos con STRUCTURE. Para los microsatélites, se muestran los análisis basados en F_{ST} y R_{ST}.

Los análisis de STRUCTURE determinaron que el número más probable de *clusters* ancestrales fue de $K = 5$ (a juzgar por las *posterior probabilities*; se obtuvieron valores muy similares y sólo puntualmente más bajos para $K = 6$, y ligeramente mayores para $K = 4$, por lo que se optó por mantener $K = 5$, también para mejorar la interpretación de los *clusters* obtenidos). Las proporciones de pertenencia a cada uno de los cinco *clusters* variaron drásticamente entre las poblaciones, con valores de pertenencia al *cluster* mayoritario superiores al 80% en todas las poblaciones analizadas salvo en las de Hoces del Cabriel y Pallarés (Figura 5.4). Puesto que el criterio empleado para clasificar las poblaciones consistió en asociar cada una de ellas al *cluster* con mayor probabilidad de asignación (véase Material y métodos), las poblaciones de Aranjuez y Hoces del Cabriel quedaron asignadas al *cluster* 1, Abrucena al *cluster* 2, Pallarés al *cluster* 3 y Cabañas al *cluster* 5. Por su parte, las poblaciones de Pelahustán, Villuercas, Navacerrada y El Pardo quedaron asociadas al *cluster* 4. Hoces del Cabriel fue la única de las nueve localidades con valores de pertenencia al *cluster* mayoritario por debajo del 50%, y fue por tanto la que presentó un mayor grado de mezcla entre los

		Psal1	Psal2	Psal3	Psal4	Psal5	Psal7	Psal8	Media
Aranjuez	N	33	28	32	33	31	32	30	31.3
	A	9	7	13	1	12	9	18	9.9
	U	0	0	0	0	2	0	3	0.7
	R	8	7	15	0	23	9	20	11.7
	H ₀	0.848	0.500	0.844	0	0.871	0.594	0.933	0.656
	H _E	0.865	0.588	0.896	0	0.880	0.867	0.933	0.718
Hoces del Cabriel	N	24	12	14	26	24	23	9	18.9
	A	11	9	9	1	9	8	10	8.1
	U	0	0	0	0	1	0	0	0.1
	R	13	8	9	0	13	7	19	9.9
	H ₀	0.792	0.667	0.929	0	0.833	0.783	0.778	0.683
	H _E	0.884	0.844	0.878	0	0.863	0.792	0.928	0.741
Abrucena	N	27	26	27	27	25	27	27	26.6
	A	11	8	12	1	13	8	14	9.6
	U	0	0	2	0	6	1	1	1.4
	R	11	8	44	0	24	9	15	15.9
	H ₀	0.889	0.769	0.778	0	0.720	0.852	0.778	0.684
	H _E	0.871	0.855	0.885	0	0.864	0.816	0.877	0.738
Pelahustán	N	31	31	31	31	31	31	31	31.0
	A	10	6	15	5	8	9	13	9.4
	U	0	0	0	2	0	0	1	0.4
	R	9	8	23	18	7	8	14	12.4
	H ₀	0.806	0.710	0.871	0.161	0.774	0.677	0.871	0.696
	H _E	0.827	0.750	0.922	0.155	0.787	0.809	0.912	0.737
Villuercas	N	36	36	36	36	36	36	36	36.0
	A	10	7	20	6	9	12	15	11.3
	U	0	0	2	1	0	2	0	0.7
	R	8	9	33	14	8	15	17	14.9
	H ₀	0.833	0.639	0.944	0.194	0.722	0.861	0.917	0.730
	H _E	0.859	0.761	0.932	0.257	0.855	0.856	0.897	0.774
Pallarés	N	28	27	28	29	27	27	28	27.7
	A	13	12	12	1	9	9	15	10.1
	U	3	2	1	0	0	1	0	1.0
	R	21	14	26	0	9	11	21	14.6
	H ₀	0.786	0.741	0.857	0	0.556	0.667	0.893	0.643
	H _E	0.895	0.864	0.890	0	0.790	0.862	0.932	0.748
Navacerrada	N	25	25	25	25	25	25	25	25.0
	A	10	6	19	4	10	10	12	10.1
	U	0	0	2	2	0	0	0	0.6
	R	10	5	26	11	10	9	14	12.1
	H ₀	0.760	0.840	0.880	0.120	0.760	0.840	0.880	0.726
	H _E	0.889	0.744	0.944	0.118	0.822	0.806	0.888	0.744
El Pardo	N	34	33	33	34	33	33	33	33.3
	A	9	5	17	4	8	7	10	8.6
	U	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	8	4	25	14	7	7	13	11.1
	H ₀	0.853	0.667	0.788	0.059	0.909	0.818	0.818	0.702
	H _E	0.843	0.690	0.917	0.087	0.823	0.794	0.875	0.718
Cabañas de Tera	N	26	25	25	28	25	24	26	25.6
	A	8	6	15	1	10	11	7	8.3
	U	1	1	1	0	2	2	0	1.0
	R	7	5	18	0	10	16	13	9.9
	H ₀	0.769	0.640	0.920	0	0.680	0.917	0.769	0.671
	H _E	0.829	0.782	0.911	0	0.772	0.893	0.753	0.706

Tabla 5.4. Diversidad genética de nueve poblaciones de *P. algirus* para siete loci de microsatélites. Para cada población y locus se indica el número de individuos genotipados (N), el total de alelos (A), el total de alelos únicos (U), el rango alélico (R, diferencia entre el mayor y el menor alelo en número de repeticiones), la heterocigosidad observada (H₀) y esperada (H_E). En la última columna se muestran los valores medios para los siete loci.

hipotéticos *clusters* ancestrales; la población de Pallarés se caracterizó igualmente por exhibir un grado alto de combinación de *clusters*, aunque con claro predominio (70.9%) del *cluster* 3.

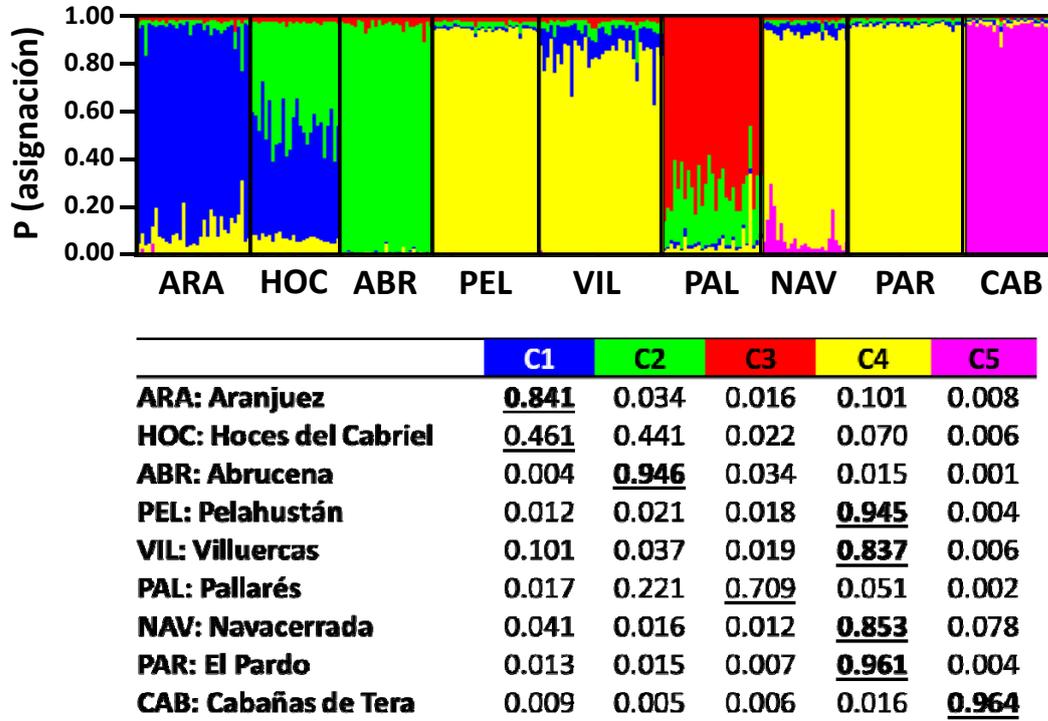


Figura 5.4. Resultado del análisis bayesiano de estructura poblacional obtenido con STRUCTURE a partir de siete loci de microsatélites para nueve poblaciones de *P. algirus*. En la parte superior se muestra la representación gráfica del grado de estructura. El eje horizontal muestra las distintas poblaciones y el eje vertical indica la probabilidad de asignación de cada individuo a cada uno de los cinco *clusters* ancestrales (representados mediante colores). En la tabla inferior se indican las proporciones de pertenencia de las poblaciones a los distintos *clusters*. Los valores que definen el *cluster* al que se asocia cada población (es decir, los valores máximos para cada fila) aparecen subrayados, mientras que los valores ≥ 0.80 aparecen en negrita.

Por otra parte, y como era de esperar, las distancias nucleares mostraron un patrón diferente a las calculadas con el ADN mitocondrial (para el cálculo de distancias nucleares no se tuvo en cuenta la población de Hoces del Cabriel, con valores próximos a cero para la mayoría de las comparaciones debido probablemente a la baja proporción de individuos para los que pudieron amplificarse con éxito todos los loci de microsatélites). En general, las distancias calculadas en base a los microsatélites (Tabla 5.2 B) reflejaron los resultados obtenidos con STRUCTURE. Así, la población de Cabañas (que prácticamente fue la única representante del *cluster* 5 y la primera en

diferenciarse en todos los análisis con $K \geq 2$; véase la Figura 5.4) fue la que mostró mayores distancias con el resto de localidades (valor medio, ± 1 sd, de las distancias F_{ST} : 0.098 ± 0.015). Abrucena (media de $F_{ST} = 0.054 \pm 0.029$) y Aranjuez (0.049 ± 0.028), las otras dos poblaciones más claramente diferenciadas en cuanto a la agrupación por *clusters* (Figura 5.4), mostraron también distancias mayores con las demás localidades que el resto de las poblaciones (Tabla 5.2 B). Por su parte, las poblaciones asociadas al *cluster* 4 (i.e. Navacerrada, El Pardo, Pelahustán y Villuercas, véase la Figura 5.4) mostraron en general distancias pequeñas (con valores de F_{ST} comprendidos entre 0.005 y 0.026) y poco significativas entre ellas, sobre todo en valores de R_{ST} . Pallarés, la población a priori con mayor grado de mezcla entre *clusters*, mostró distancias pequeñas tanto con Abrucena (*cluster* 2; $F_{ST} = 0.023$) como con el conjunto de poblaciones del *cluster* 4 (valores de F_{ST} entre 0.020 y 0.031).

Los AMOVAs realizados con datos de microsatélites en base al origen mitocondrial no ofrecieron diferencias significativas entre los linajes, aunque sí entre poblaciones dentro de linajes (Tabla 5.3 B), un resultado nada sorprendente si se tiene en cuenta que el linaje occidental, por ejemplo, incluye poblaciones con microsatélites tan distintos como Pallarés, Cabañas y Pelahustán o El Pardo. Sin embargo, y como era de esperar, la agrupación por *clusters* ofreció diferencias significativas entre grupos, tanto en valores de F_{ST} como de R_{ST} . Aunque las diferencias entre individuos dentro de cada población abarcaron la mayor parte de la variación genética, las diferencias entre *clusters* explicaron un mayor porcentaje de varianza (3.8 y 11.9 % para los AMOVAs basados en F_{ST} y R_{ST} , respectivamente) que las diferencias entre poblaciones del mismo *cluster*. Por último, los AMOVAs con el ADN mitocondrial clasificado en función de los *clusters* definidos por los microsatélites ofrecieron resultados no significativos para los *clusters* (25.6% de la varianza) pero sí para las diferencias entre poblaciones de un mismo *cluster* (54.9% de la varianza), lo que resulta lógico teniendo en cuenta que el *cluster* 4, por ejemplo, incluye poblaciones del linaje oriental (Pelahustán), occidental (El Pardo y Navacerrada) y “mixtas” (Villuercas). Parece, por tanto, que el flujo génico entre las poblaciones del centro de la Península es el principal responsable de la disociación entre la estructura genética definida por los dos tipos de marcadores, mitocondriales y nucleares, como demuestra el hecho de que si se repite el AMOVA con el ADN mitocondrial entre *clusters* excluyendo el *cluster* 4, las diferencias entre

clusters (Aranjuez + Hoces del Cabriel, Abrucena, Pallarés y Cabañas) pasan a ser del 88.6% (resultados no mostrados).

Flujo génico entre las poblaciones

Los análisis con IMA2 arrojaron niveles de repetibilidad satisfactorios para las estimas de m (coeficiente de correlación intraclase = 0.807, $F_{7,18} = 14.09$, $P < 0.001$). Los patrones de flujo resultantes coincidieron en líneas generales con los obtenidos a partir de los análisis de los microsatélites. En particular, cabe destacar que todos los valores de m por encima de 1 se dieron entre poblaciones del *cluster* 4 (Tabla 5.5); llama la atención el hecho de que las dos principales poblaciones “donadoras de alelos”, a saber, El Pardo y Pelahustán, se localizan en sendas manchas del encinar que forma un corredor prácticamente continuo a lo largo de la falda sur del Sistema Central y del que El Pardo sería el último gran bosque.

	Aranjuez	Hoces	Abrucena	Pelahustán	Villuercas	Pallarés	Navacerrada	El Pardo	Cabañas
Aranjuez	-	0.02	0.19	0.05	0.00	0.09	0.00	0.01	0.00
Hoces	0.06	-	0.63	0.04	0.23	0.68	0.00	0.00	0.00
Abrucena	0.02	0.02	-	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pelahustán	0.01	0.02	0.04	-	2.34	0.05	0.98	3.09	0.00
Villuercas	0.00	0.00	0.01	0.17	-	0.02	0.14	0.24	0.01
Pallarés	0.03	0.03	0.07	0.08	0.12	-	0.00	0.00	0.01
Navacerrada	0.10	0.00	0.00	0.64	0.81	0.04	-	0.00	0.04
El Pardo	0.00	0.02	0.03	2.45	1.23	0.33	2.00	-	0.00
Cabañas	0.00	0.05	0.00	0.00	0.02	0.04	0.04	0.06	-

Tabla 5.5. Flujo génico entre nueve poblaciones de *P. algirus* estimado con IMA2 en base a secuencias mitocondriales y siete loci de microsatélites. Los valores muestran la tasa de migración (m) entre la población de origen (fila) y la población de destino (columna). Los valores de m mayores de 1 se indican en negrita.

Discusión

Los datos presentados en este capítulo demuestran la existencia de una marcada estructura genética en las poblaciones ibéricas de *P. algirus*, corroborando en lo esencial las conclusiones de trabajos anteriores (Carranza et al. 2006, Verdú-Ricoy et al. 2010, Fitze et al. 2011). Sin embargo, nuestros resultados amplían sustancialmente la cobertura geográfica, tanto en extensión como en nivel de detalle para el centro de la

Península. Además, proporcionan información sobre procesos biogeográficos de contracción y expansión de las áreas de distribución, aislamiento en refugios pleistocénicos, (re)colonización de (nuevas) áreas, y establecimiento de zonas de contacto secundario entre clados o linajes. En esta sección trataremos de clarificar:

1. La estructura genética de *P. algirus* y la distribución de los filogrupos mitocondriales, enfatizando los indicios de expansión demográfica y comparando nuestros patrones filogeográficos con otros ejemplos publicados para tratar de encontrar posibles concordancias (Gómez y Lunt 2007).
2. La problemática que caracteriza a las poblaciones del centro de la Península, con una zona de contacto secundario entre el linaje occidental y el clado E3 en el piedemonte meridional del Sistema Central; en relación con estas poblaciones, plantearemos algunas hipótesis sobre las circunstancias ecológicas que podrían explicar los patrones filogeográficos observados.

Estructura filogeográfica y vicisitudes plio-pleistocénicas

La red de haplotipos mitocondriales reflejó, en sintonía con la información ya publicada (Carranza et al. 2006, Verdú-Ricoy et al. 2010, Fitze et al. 2011), una profunda diferenciación ancestral de *P. algirus* en dos linajes, uno occidental y otro oriental, que debió producirse en la Península Ibérica hace entre 3.6 y 3 Ma (Carranza et al. 2006, Fitze et al. 2011), es decir, antes de comenzar los ciclos glaciares del Pleistoceno. Situaciones de este tipo, en las que el primer nivel de diferenciación intraespecífica tiene un claro componente longitudinal, separando dos grupos de secuencias a lo largo de un gradiente este-oeste, se han descrito para *Lacerta schreiberi* y para todos los lacértidos ibéricos con una distribución lo suficientemente amplia en la región mediterránea de la Península, esto es, al sur de la Cordillera Cantábrica y los Pirineos (Tabla 5.6). El complejo de especies de *Podarcis hispanica*, que constituiría la única excepción, representa un caso más problemático debido a la falta de una taxonomía asentada, al elevado número de linajes que comprende, y a la probable existencia de fenómenos de introgresión mitocondrial, pero aún así es evidente que las divisiones filogeográficas más antiguas reflejan siempre un componente este-oeste (Harris et al. 2004, Pinho et al. 2007b, Renoult et al. 2009). En particular, llama la atención la similitud entre el patrón filogeográfico obtenido en esta memoria y el

descrito por Fitze et al. (2011) para la especie congénérica *P. hispanicus*. En ambos casos, la división más antigua es entre un linaje occidental (con un subclado meridional parafilético, equiparable a W1 más las poblaciones meridionales de Málaga de la Figura 2.2, y otro septentrional derivado del anterior, análogo de W2; véase el Capítulo 2) y un linaje centro-oriental (Fitze et al. 2011) dividido en un clado central (análogo a E3) y otro oriental en el que las poblaciones de Granada y Almería (~E1) forman el grupo hermano de las situadas más al norte (~E2). Aunque nuestros análisis sugieren que E1 es el grupo hermano de E2 y E3 (en vez de ser E3 el grupo hermano de E1 y E2), la separación de los linajes orientales es en todo caso muy antigua, por lo que las relaciones entre E1, E2 y E3 no están definitivamente resueltas. Sea como fuere, un nivel de concordancia tan acentuado entre las dos especies ibéricas del género *Psammodromus* sugiere vicisitudes pleistocénicas comunes, con situaciones de simpatria en los mismos o parecidos refugios glaciares y procesos de expansión similares en la Península Ibérica (Gómez y Lunt 2007).

Especie	Antigüedad (Ma)	Estructura filogeográfica	Referencia y tipo de marcador
<i>Lacerta schreiberi</i>	2.75 (Plioceno tardío)	Un clado occidental (NO de Iberia y S de Portugal) y otro oriental (Sistema Central y Montes de Toledo).	Paulo et al. 2001 (M) Godinho et al. 2008 (M y N †)
<i>Timon lepidus</i>	9.4 (Mioceno)	Un clado al SE (Sierras Béticas, <i>T.l. nevadensis</i>) y otro en el resto de Iberia (<i>T.l. lepidus</i>).	Miraldo et al. 2011 (M y N)
<i>Acanthodactylus erythrurus</i>	< 5 (Plio-Pleistoceno)	Un clado occidental (N de Portugal y Cádiz) y otro oriental (Tarragona y Valencia).	Harris et al. 2004 (M)
<i>Psammodromus hispanicus</i>	8.25 (Mioceno)	Un clado occidental y otro centro-oriental.	Fitze et al. 2011 (M y N)
<i>Psammodromus algirus</i>	3.6 (Plioceno tardío) 3.0 (Plioceno tardío)	Un clado occidental y otro oriental.	Carranza et al. 2006 (M) Fitze et al. 2011 (M y N)

† Los marcadores nucleares reflejan un proceso intermitente de mezcla entre los dos linajes a lo largo del Pleistoceno

Tabla 5.6. Especies de lacértidos ibéricos para las que se ha descrito una diferenciación antigua (anterior al Pleistoceno) entre un linaje occidental y otro oriental. Tipos de marcadores moleculares: M = ADN mitocondrial, N = ADN nuclear.

Por otra parte, en el caso de *P. algirus* la distribución y preferencias de hábitat de las poblaciones actuales, junto con la filogeografía de las especies forestales que

conforman el hábitat seleccionado, sugieren un escenario verosímil para la diferenciación de los dos linajes principales. Así, la especie aparece actualmente asociada a bosques y orlas arbustivas forestales con elevada cobertura de matorral bajo (Díaz y Carrascal 1991), alcanzando las mayores abundancias en encinares de monte bajo y en robledales aclarados. Aunque las densidades, la tasa de crecimiento y la fecundidad (Díaz 1997, Iraeta et al. 2006), así como la frecuencia de ocupación de parches en hábitats fragmentados (Santos et al. 2008), son mayores en los robledales, hay también indicios de una buena condición física en los encinares, como el mayor tamaño medio de los huevos (Iraeta et al. 2006, Díaz et al. 2007) y el mayor desarrollo de las señales sexuales de los machos, tanto químicas como visuales, en las poblaciones de los encinares (Iraeta et al. 2011).

Pues bien, los análisis filogeográficos realizados con las especies de *Quercus* de hoja caduca (incluyendo especies típicamente mediterráneas como *Q. pyrenaica*, *Q. faginea* y *Q. canariensis*) han revelado dos linajes claramente diferenciados a lo largo de una línea que recorre la Península aproximadamente desde Gibraltar hasta los Pirineos occidentales, es decir, atravesando el área de distribución del clado E3 de *P. algerius* (Petit et al. 2002a y 2002b) y dejando al este las áreas de E1 y E2 y al oeste las de W1 y W2. Ambos linajes de robles se encuentran ampliamente diversificados, lo que indica una larga persistencia en refugios separados que debieron situarse cerca de las costas mediterránea y atlántica, desde donde debieron expandirse hacia el interior hasta restablecer contacto en el centro de la Península; los datos paleopalinológicos sitúan los refugios en el sur (Brewer et al. 2002), mientras que los datos genéticos sugieren que también pudieron existir refugios en fondos de valle situados más al norte (Olalde et al. 2002). Por lo que concierne a los encinares, *Quercus ilex* L. alcanzó la Península desde el sur cruzando el estrecho de Gibraltar; la distribución de haplotipos en esta especie es similar a la de los robles, con dos linajes bien desarrollados y claramente diferenciados en los sectores oriental y occidental sin apenas flujo a lo largo del Cuaternario (Lumaret et al. 2002). Los análisis combinados de datos filogeográficos y paleopalinológicos sugieren la existencia de numerosos encinares relictos que pudieron actuar como refugios durante el último máximo glacial tanto en la costa como en el interior (López de Heredia et al. 2007).

El tipo de escenario descrito supone, en definitiva, que las regiones más meridionales de la Península debieron actuar como reservas de riqueza y diversidad

genética durante los picos glaciares, y como puntos de partida para la posterior recolonización de las regiones situadas más al norte, que son las que actualmente exhiben niveles menores de diversidad (el patrón de “riqueza meridional vs. pureza septentrional”; véase Hewitt 2000). En *P. algirus*, dos tipos de evidencias parecen confirmar este fenómeno. En primer lugar, los haplotipos más ancestrales se han encontrado en las poblaciones mediterráneas del sur de la Península Ibérica (como Málaga, para el linaje occidental, o Almería, para el oriental; Verdú-Ricoy et al. 2010, véase el Capítulo 2). Por otro lado, los resultados de nuestro estudio confirman la existencia de una relación inversa entre la latitud y la diversidad genética en el ADN mitocondrial (diversidad nucleotídica y número de haplotipos únicos), siendo las poblaciones más meridionales las que exhiben mayores niveles de riqueza y diversidad genética; la rápida colonización de las localidades situadas más al norte o a mayor altitud al producirse la mejora del clima habría dado lugar, en mayor o menor medida, a una serie de cuellos de botella que habrían hecho que los genes de las poblaciones localizadas en el “borde de la expansión” estuvieran sobrerrepresentados en el acervo génico de las poblaciones del norte (Ibrahim et al. 1996, Avise 2000), a la vez que faltaría la mayor parte de la riqueza genética presente en los refugios meridionales.

Sin embargo, bajo este escenario de antiguos y sucesivos ciclos de contracción y diferenciación en refugios aislados unos de otros, intercalados con fases de expansión altitudinal o hacia latitudes más septentrionales, se esperaría también que ciertos haplotipos “intermedios” entre los grupos actualmente diferenciados (Figura 5.2) estuvieran presentes en las poblaciones más meridionales (Pallarés, Abrucena y Morata), en las que por el contrario se encontraron haplotipos muy divergentes entre sí, y sin que ninguno de ellos presentara una situación intermedia entre los clados meridionales (E1 y W1) y septentrionales (W2, E2 y E3) de la red de haplotipos. Este hecho podría obedecer a dos posibles causas: 1) un escaso muestreo de las localidades del sur de la Península, en cuyo caso esperaríamos encontrar dichos haplotipos a medida que obtuviéramos secuencias mitocondriales de más poblaciones, o 2) su posible desaparición por extinciones locales relacionadas con los cambios climáticos derivados de los episodios glaciares, en cuyo caso parece probable que los altos niveles de diversidad de las poblaciones meridionales no se deban solamente a la acumulación de riqueza genética durante los eventos glaciares, sino quizás también a fenómenos más recientes de contacto secundario entre los distintos clados. Este segundo escenario sí

parece apoyado por nuestros resultados, pues de hecho, si observamos la red de haplotipos (Figura 5.2), parece evidente que los filogrupos W2, E2 y E3, a diferencia de W1 y E1, poseen una tipología de estrella, un patrón típico de las poblaciones en expansión (Avise et al. 1984, Slatkin y Hudson 1991, Avise 2000) que queda además confirmado por los análisis de *mismatch distribution* y las estimas de R_2 . Así, las expansiones geográficas de estos tres grupos habrían originado la aparición de las poblaciones “mixtas” detectadas en este estudio, como Abrucena y Morata (resultado de la expansión al sur de E2 y el posterior contacto con E1), Pallarés (resultado de la expansión al sur de W2 y el posterior contacto con W1), y Villuercas (expansión de E3 hacia el oeste y posterior contacto con W1). Este escenario vendría a confirmar, en primer lugar, la existencia de múltiples refugios ibéricos (Gómez y Lunt 2007) para *P. algirus* durante el Cuaternario, y en segundo lugar, el papel de estos refugios meridionales no sólo como *hotspots* sino también como crisoles de biodiversidad (Pinho et al. 2007a, b, Godinho et al. 2008).

El clado E3 y la zona de discordancia cito-nuclear en el centro de la Península

Parece claro, en consecuencia, que los filogrupos del interior peninsular han experimentado expansiones recientes, posiblemente relacionadas con la mayor o menor extensión de los hábitats favorables y en tanto en cuanto no han encontrado barreras geográficas importantes a la dispersión (cabe destacar, por ejemplo, que no se han encontrado haplotipos del grupo W1 al norte del Tajo, como tampoco se han encontrado haplotipos del grupo E3 al norte del Sistema Central). En este sentido, es particularmente interesante discutir las causas que han podido influir sobre la discordancia entre la señal mitocondrial y los microsatélites nucleares que se da en las poblaciones del *cluster* 4, situadas en su mayoría en el piedemonte meridional de los sistemas montañosos del centro de la Península (Sistema Central y Montes de Toledo). Esta discordancia se da porque el *cluster* 4, definido a partir de los microsatélites, incluye dos poblaciones con haplotipos mitocondriales del linaje occidental (W2; El Pardo y Navacerrada), una población con haplotipos orientales (E3; Pelahustán), y la única población (Villuercas) con haplotipos de ambos linajes (W1 y E3). Así por ejemplo, en la Figura 5.4 llama la atención el parecido entre los microsatélites de El Pardo (W2) y Pelahustán (E3), dos poblaciones conectadas por un corredor continuo de hábitat favorable (los bosques de encinas de la falda sur del Sistema Central) que habría

permitido el contacto inicial entre ambas poblaciones y el flujo actual de genes nucleares. De hecho, las estimas realizadas con IMA2, que tienen en cuenta todos los marcadores empleados en este estudio, confirman que los niveles más altos de flujo se dan precisamente entre las poblaciones del *cluster* 4, muy especialmente entre El Pardo y Pelahustán. En este punto, y dados los niveles tan significativos de flujo génico entre estas poblaciones, parece lógico preguntarse por qué no hemos encontrado ninguna evidencia de mezcla mitocondrial entre ellas (es decir, localidades “híbridas” con haplotipos de W2 y E3). De hecho, la mayor precisión de los marcadores nucleares (recombinantes y de herencia biparental) frente a los genes mitocondriales (no recombinantes y heredados por vía materna) a la hora de reflejar patrones e historias poblacionales complejas es un fenómeno bien documentado (Godinho et al. 2008). En nuestro caso, la ausencia de poblaciones “híbridas” en el ADN mitocondrial podría estar relacionada con las mayores tasas de dispersión de los machos de *P. algirus*, más activos y con mayores áreas de campeo que las hembras (Díaz 1991 y 1993); el mismo patrón ha sido descrito en otras especies de lacértidos, cuyas hembras suelen ser filopátridas respecto a su localidad natal (Godinho et al. 2006a). Así, un flujo génico mediado predominantemente por los machos de los clados W2 y E3 en el piedemonte meridional del Sistema Central y Montes de Toledo explicaría la escasa diferenciación de sus marcadores nucleares, al tiempo que su antigua señal filogeográfica (mitocondrial) permanecería intacta, especialmente si el contacto se ha producido recientemente y las hembras no han tenido tiempo de colonizar la zona de contacto, o si los alelos foráneos gozan de algún tipo de ventaja selectiva (véase el Capítulo 6). Es de esperar, pues, que tras sucesivas generaciones, las hembras de ambos grupos se acaben encontrando, y se pueda detectar una huella mitocondrial del contacto entre W2 y E3 como de hecho ya se ha encontrado para el contacto entre W1 y E3 (en las localidades de Villuercas y Virgen de la Cabeza, véase el Capítulo 2), y entre filogrupos claramente diferenciados de otras especies de lacértidos como *Timon lepidus* (Miraldo et al. 2011), *Zootoca vivipara* (Heulin et al. 2011) o *Lacerta schreiberi* (Godinho et al. 2008).

La hipótesis que proponemos para explicar este patrón filogeográfico es que el clado E3, con un área de distribución básicamente parapátrida respecto a E2 (al este) y a W1-W2 (al oeste; véase la Figura 5.1), tras haberse diferenciado de su grupo hermano (posiblemente E2) en algún momento de contracción a un refugio del interior de la Península a mediados del Pleistoceno, se habría expandido durante los periodos de

clima favorable, incluyendo la época actual. Las pruebas de esta expansión son incluso más claras que para los otros filogrupos del interior peninsular, a juzgar por la topología en forma de estrella de su red de haplotipos, su bajo valor de R_2 y, sobre todo, el ajuste casi perfecto de su *mismatch distribution* a lo esperado bajo un modelo de expansión demográfica reciente (Rogers y Harpending 1992, Ramos-Onsins y Rozas 2002, Librado y Rozas 2009). La expansión de E3 habría tenido lugar desde algún punto, posiblemente del valle del Tajo, en todas direcciones. Por el norte-noroeste, habría establecido contacto, puede que en época reciente, con poblaciones de los clados W1 y W2 del linaje occidental; a este respecto, es importante volver a mencionar las evidencias de flujo entre las poblaciones del *cluster* 4 (véanse la Figura 5.4 y las Tablas 5.4 y 5.5), a las que habría que añadir la prueba irrefutable de la presencia sintópica de haplotipos W1 y E3 en la población de Villuercas. Así mismo, hay evidencias puntuales de poblaciones con haplotipos de ambos linajes, oriental (E3) y occidental (W1), en zonas del suroeste (por ejemplo Virgen de la Cabeza, en Córdoba; véase el Capítulo 2). Por el este y el sudeste, sin embargo, la expansión parece más limitada. Así, y aunque los marcadores de las poblaciones más al sudeste (Valdepeñas y Despeñaperros) muestran, al igual que algunas de las poblaciones del oeste, un patrón típico de “borde de expansión” (Paulo et al. 2001, Pinho et al. 2007a, Miraldo et al. 2011, Charruau et al. 2011), con haplotipos tanto más derivados cuanto más periférica sea su localización (por ejemplo, haplotipos 35 a 38 en Valdepeñas, y 39 a 42 en Despeñaperros), llama la atención el hecho de que no hayamos conseguido encontrar ninguna población en la que aparezcan a la vez haplotipos de los clados E2 y E3. De hecho, sorprende que sea ésta la única situación de sintopía entre haplotipos de clados distintos que todavía no se ha detectado, de entre todas las que resultan verosímiles desde un punto de vista geográfico, es decir, excluyendo el contacto entre E1 y el linaje occidental, a cientos de kilómetros de distancia, y el posible contacto entre E2 y W2 en la mitad oriental de la meseta norte, una región que se ha muestreado poco y en la que la especie comienza a escasear, a la vez que sus poblaciones van quedando cada vez más fragmentadas (Díaz et al. 2000, Díaz et al. 2007, Santos et al. 2008, Tellería et al. 2011). Las restantes posibilidades de “hibridación” entre clados sí que han sido descritas, bien por nosotros, bien en el muestreo de Carranza et al. (2006): entre E1 y E2 (poblaciones de Abrucena y Morata), entre W1 y W2 (Pallarés), entre E3 y W1 (Villuercas y, según datos de Carranza et al. 2006, también otras localidades de las provincias de Cáceres y Córdoba), y entre E2 y W1 (provincias de Cádiz y Málaga según datos de Carranza et al. 2006).

Nuestra hipótesis es, por tanto, que las actuales poblaciones ibéricas de *P. algirus* forman, al menos en el centro de la Península, dos acervos génicos originados a partir de al menos tres refugios glaciares que estuvieron aislados durante un tiempo lo suficientemente largo como para dejar una huella estable en el ADN mitocondrial, circunstancia que vendría reforzada por la escasa capacidad de dispersión de la especie (Santos et al. 2009). El primer conjunto estaría formado por el linaje occidental y el clado E3, y el segundo por el clado E2 del linaje oriental. Ambos acervos podrían establecer contacto en la mitad oriental de la meseta norte y, sobre todo, en el extremo sur de la península, aspecto éste que debería ser investigado en profundidad. Sin embargo, en el centro de la Península los dos acervos permanecerían separados porque habría una discontinuidad de hábitat que impediría a las poblaciones del clado E3 restablecer contacto con el resto del linaje oriental (Figura 5.1). Dicho de otro modo: la expansión de E3 hacia el este se vería frenada por la interrupción del tipo de hábitat al que se han venido adaptando, en tiempos más o menos recientes, las poblaciones de la mitad occidental de la Península.

¿Qué tipo de evidencias avalan esta hipótesis? En primer lugar, la modelización del nicho de los linajes de la especie más emparentada con *P. algirus*, la lagartija cenicienta *P. hispanicus* (que como se ha comentado tiene también tres linajes cuya distribución coincide aproximadamente con la de los grupos occidental [W1+W2], central [E3] y oriental [E1+E2] de *P. algirus*), pone de manifiesto diferencias significativas en el hábitat más adecuado para cada uno de ellos (Fitze et al. 2011). Así, el linaje oriental de *P. hispanicus* ocupa zonas cálidas y secas, con poca cobertura de vegetación, en la franja mediterránea de la Península; el central vive en zonas más continentales, con cobertura vegetal intermedia; y el occidental se distribuye por las manchas y orlas arbustivas forestales, más húmedas y con mayor cobertura vegetal, de la mitad oeste de la Península. Pero sobre todo, llama la atención el hecho de que la divergencia de nicho es el factor invocado por Fitze et al. (2011) para explicar la falta de flujo génico entre los linajes central y oriental.

En segundo lugar, disponemos de evidencias indirectas que implican que las respuestas ecológicas del clado E3 son más parecidas a las del linaje occidental que a las de los clados E1 y E2 (Capítulo 3). El tiempo de incubación de las hembras del clado E3, a igualdad de condiciones climáticas (pues es bien sabido que entre los reptiles ovíparos la incubación se acorta en las poblaciones de climas más fríos; Qualls

y Shine 1998, Shine 2005, Oufiero y Angilletta 2006, Niewiarowski y Angilletta 2008, Du et al. 2010a), se parece mucho más al de las hembras occidentales que a los de las hembras del este peninsular. Así, si se vuelve a realizar el ANCOVA de la Figura 3.3 (variación del tiempo de incubación en función del clima y el linaje mitocondrial) clasificando las poblaciones en dos grupos, W1+W2+E3 frente a E1+E2, el efecto del factor de clasificación pasa de tener una β de 0.775 ($P = 0.003$) a tener una β de 0.906 ($P \ll 0.001$), y el modelo pasa de explicar el 67.3% de la varianza en los tiempos de incubación ($F_{2,10} = 10.3$, $P = 0.004$) a explicar el 90.7% de dicha varianza ($F_{2,11} = 53.8$, $P \ll 0.001$).

Por último, y como se verá en el último capítulo, la fuente de evidencia más clara acerca de la adaptación de las lagartijas del clado E3 a hábitats “de tipo occidental” viene dada por el hecho de que el patrón de coloración dorsal –que puede ser más o menos “rayado” en función de la presencia o no, y del grado de desarrollo, de una línea oscura mediodorsal y otras dos en los lados del dorso (véase la Figura 6.1 del capítulo siguiente) no permite diferenciar a las lagartijas del clado E3 de las occidentales, mientras que discrimina claramente a las poblaciones del clado E2. Pues bien, el aspecto fundamental, que se abordará en el Capítulo 6, es que la coloración dorsal tiene un fuerte componente de adaptación al hábitat por su implicación en fenómenos de crípsis (Forsman y Shine 1995b, Stuart-Fox et al. 2004, Rosenblum 2006), ya que el patrón de coloración dominante en cada hábitat (con frecuencias que, en promedio, superan el 80% de los individuos) es el que hace más difícil la detección de las lagartijas (véase el Capítulo 6).

Estos argumentos, unidos a la compleja configuración fitosociológica del centro de la Península, apoyan la idea de que sus poblaciones de *P. algirus* forman dos conjuntos genética y fenotípicamente diferenciados, sin flujo apreciable entre ellos. Además, se da la peculiaridad de que el grupo occidental tendría un doble origen filogeográfico en relación a los dos linajes mitocondriales, oriental y occidental, separados desde el Plioceno, pues incorpora poblaciones del linaje occidental junto a un grupo, E3, de origen oriental, mezclándose ambos a lo largo de la zona de contacto. Sin embargo, el grupo occidental no establecería contacto con el oriental (lo que explicaría la ausencia de poblaciones con haplotipos de E2 y E3) debido a la adaptación de ambos a hábitats distintos, que quedaría reflejada en las diferencias fenotípicas comentadas.

Podemos concluir, por tanto, que nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de utilizar distintos marcadores para comprender la historia evolutiva y situación actual de las especies, así como la importancia del hábitat como modulador del contacto secundario y convergencia fenotípica entre poblaciones de distintos filogrupos que se han adaptado a ambientes similares (como las del linaje occidental y E3), o de la divergencia entre clados del mismo filogrupo (E2 y E3) adaptados a hábitats distintos.

VI. Capítulo 6

Biogeografía de la coloración dorsal en poblaciones ibéricas de lagartija colilarga: ¿estructura filogeográfica o adaptación para facilitar la cripsis?

Biogeografía de la coloración dorsal en poblaciones ibéricas de lagartija colilarga: ¿estructura filogeográfica o adaptación para facilitar la cripsis?

Resumen: La selección natural y las restricciones al flujo génico son factores decisivos para comprender el origen y mantenimiento de la diversidad biológica, pero su importancia relativa puede variar espacial y temporalmente, dando lugar a complejos patrones de variación genética y fenotípica. El objetivo de este capítulo es destacar la interacción de eventos ancestrales de divergencia y procesos actuales de adaptación a la hora de dar forma a la coloración dorsal de las lagartijas colilargas ibéricas en un contexto filogeográfico explícito. Para ello, examinamos el patrón de coloración dorsal (rayado vs. no rayado) y las relaciones filogenéticas de 23 poblaciones ibéricas de *Psammodromus algirus*. Para comprobar la hipótesis de que los patrones de coloración han evolucionado como una adaptación para la mejora de la cripsis, comparamos los tiempos empleados por depredadores simulados (humanos) para detectar lagartijas rayadas y no rayadas en diferentes ambientes.

Todas las lagartijas fueron clasificadas en dos grupos en base a su ADN mitocondrial (Capítulo 5): 1) un linaje occidental con clados sudoccidental (W1) y noroccidental (W2); y 2) un linaje oriental con un clado suroriental (E1), un clado ampliamente distribuido por la mitad oriental (E2) y un clado central (E3). La coloración dorsal varió marcadamente entre los clados: las poblaciones orientales (E1 y E2) fueron principalmente rayadas (porcentaje medio de lagartijas rayadas = 90.5%), mientras que las poblaciones centrales y occidentales (E3, W1 y W2) fueron básicamente no rayadas (porcentaje medio de lagartijas rayadas = 9.5%). Dos experimentos apoyaron la hipótesis de que esta distribución de los patrones de coloración, consistente a nivel geográfico, incrementó la capacidad de cripsis. En el primer experimento, comparamos la detectabilidad de lagartijas rayadas y no rayadas en las localidades de dos poblaciones orientales (E2) y dos poblaciones occidentales (W2). En las poblaciones orientales, las lagartijas rayadas fueron más crípticas que las no rayadas (es decir, sus tiempos de detección fueron mayores), mientras que en las localidades occidentales se obtuvo el patrón opuesto. En el segundo experimento con lagartijas de tres localidades cercanas (con haplotipos de E2, E3 y W2), los tiempos de detección en la localidad de la población E3 fueron más cortos para las lagartijas rayadas (E2) que para las no rayadas (tanto nativas como occidentales).

Por tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la coloración dorsal ha experimentado una evolución convergente en los linajes oriental y occidental en respuesta a la selección natural inducida por la depredación. Además, el análisis de 7 loci de microsátelites en las mismas tres poblaciones del segundo experimento separó las lagartijas de E2 de las de E3+W2, definiendo dos grupos distintos que se ajustaron al patrón definido por la coloración dorsal (pero no a los linajes mitocondriales). Nuestros resultados ponen de manifiesto que los patrones de flujo génico y de variabilidad fenotípica pueden verse afectados, de forma no siempre coincidente, por el aislamiento (causante de la diferenciación ancestral este-oeste), por la adaptación a hábitats distintos (responsable de la diferenciación, a nivel fenotípico y de microsátelites, de los grupos W+E3 vs. E2), o por la acción combinada de ambos tipos de factores (a la que cabe atribuir la actual falta de contacto entre los clados E2 y E3).

Introducción

Desde que en “El Origen de las especies” Darwin (1859) hiciera de las diferencias en la capacidad para escapar de los depredadores uno de los rasgos decisivos para hacer frente a lo que él denominó “la lucha por la vida” (o sea, la competencia entre individuos planteada por el hecho de que las especies tienden a reproducirse muy por encima de los niveles de población que tienen cabida en el ambiente), las adaptaciones destinadas a evitar la depredación han figurado siempre entre los temas más abordados por los ecólogos evolutivos (Werner et al. 1989, Lima y Dill 1990, Lima 1998). Esto se debe a que en el día a día, los animales pueden tener más o menos éxito en la obtención de alimento o pareja, pero a largo plazo estas fluctuaciones pueden no tener apenas efecto sobre el éxito reproductivo a lo largo de toda la vida y, por tanto, sobre la fitness; sin embargo, pocos fallos resultan tan implacables como el asociado a evitar la depredación, que reduce a cero la fitness futura. Por tanto, la depredación es un agente selectivo de primera magnitud, cuya importancia ha sido reconocida desde hace tiempo en la evolución de adaptaciones como las coloraciones tanto crípticas como aposemáticas, las estructuras de protección mecánica (conchas, caparzones, exoesqueletos) y las defensas químicas, entre otras (Edmunds 1974, Harvey y Greenwood 1978, Sih 1980 y 1987).

Según la clásica revisión de Lima y Dill (1990), el riesgo de depredación, definido como la probabilidad de ser muerto y consumido por un depredador en un tiempo determinado, es una función exponencial negativa del tiempo transcurrido en situación de vulnerabilidad, la probabilidad de que tenga lugar un encuentro con el depredador, y la probabilidad de que, ocurrido el encuentro, se produzca la captura y muerte de la presa. Aunque es obvio que todos estos parámetros pueden ser evaluados por las presas, dando forma a sus decisiones comportamentales a corto plazo (Lima y Dill 1990, Lima 1998, Pérez-Tris et al. 2004), no lo es menos que la forma más efectiva de evitar la depredación es impedir la detección por los potenciales depredadores, por lo que no es de extrañar que las adaptaciones encaminadas a promover la cripsis, y su variación al cambiar el color dominante en el entorno, figuren entre los ejemplos más conocidos de actuación de la selección natural en estado salvaje, en particular desde que Kettlewell (1955, 1956, 1958) documentara la evolución del melanismo industrial en la

polilla *Biston betularia* (un tema que desde entonces ha sido objeto de varias revisiones; véanse, por ejemplo, Majerus 1998 o True 2003).

Los lagartos y lagartijas son presas destacadas de numerosos depredadores en la mayoría de los ecosistemas de los que forman parte (Martín y López 1990). Esto se debe a que su condición ectoterma y su dieta básicamente insectívora les permiten alcanzar densidades elevadas en ambientes relativamente poco productivos en los que explotan con éxito un recurso trófico abundante, los artrópodos, que para muchos endotermos no pueden constituir la base de su alimentación por razones estrictamente energéticas (Regal 1983). Estas altas densidades, a su vez, les convierten en eficaces “condensadores de calorías” para una miríada de depredadores de rango superior, como rapaces y carnívoros diurnos. Ante una fuerza selectiva de semejante magnitud, los reptiles han desarrollado una gran variedad de estrategias antidepredatorias (Gans y Huey 1988, Martín 2002), desde la cripsis y el mimetismo (Pough 1988, Rosenblum 2006, Rosenblum et al. 2010) hasta elaboradas tácticas de escape (Greene 1988) y, como última medida, la autotomía o pérdida de la cola (Arnold 1988, Salvador et al. 1995). En particular, la cripsis es importante en situaciones en las que la probabilidad de que un animal sea depredado depende primeramente de si es detectado o no por un depredador, más que de la rapidez con la que puede escapar (Schwarzkopf y Shine 1992); en tal caso, la estrategia de huida debería basarse más en la cripsis que en la capacidad locomotora (Bauwens y Thoen 1981, Iraeta et al. 2010).

Por otra parte, una adecuada valoración del papel de la cripsis como estrategia antidepredatoria en especies ampliamente distribuidas, y que ocupan hábitats lo suficientemente diversos y contrastados, no es posible sin disponer de información sobre, al menos: 1) la variación fenotípica en los patrones de coloración y su distribución espacial, 2) las consecuencias funcionales de dicha variación en relación a la probabilidad de que las presas sean detectadas por sus potenciales depredadores, y 3) el trasfondo genético (filogeográfico) de la variación observada, que permite dilucidar si dicha variación es consistente con los patrones de diferenciación genética (de forma que cada tipo de coloración caracteriza a una determinada especie, subespecie o linaje) o si, por el contrario, las coloraciones han evolucionado de forma convergente o paralela en las distintas líneas evolutivas (Richmond y Reeder 2002, Rosenblum 2006, Rosenblum y Harmon 2011).

En este contexto, hemos aprovechado la información filogeográfica existente sobre *P. algirus* (Capítulo 5), una lagartija en la que el riesgo de depredación es un factor importante modulando las estrategias de huida y forrajeo (Martín y López 1995 y 1999, Pérez-Tris et al. 2004), para tratar de explicar la evolución de los patrones de coloración dorsal en esta especie. Observaciones preliminares (Carretero 2002 y datos propios inéditos) sugerían que las poblaciones del linaje oriental presentaban diseños rayados, típicamente con siete bandas longitudinales, dos claras y cinco oscuras, en el dorso y los flancos, mientras que las poblaciones del oeste y del centro de la Península (correspondientes en principio al linaje occidental) tenían el dorso básicamente uniforme, con las bandas longitudinales menos pronunciadas y restringidas en todo caso a los flancos. Para comprobar si estas diferencias de coloración estaban en efecto asociadas a los linajes, testar la hipótesis de que podían resultar adaptativas en relación con la cripsis, y tratar de reconstruir su evolución, se llevó a cabo la caracterización fenotípica de 23 poblaciones ibéricas para las que disponíamos de datos sobre ADN mitocondrial. Además, para una submuestra de poblaciones del centro de la Península, con información adicional sobre marcadores nucleares (microsatélites, útiles para estimar los niveles actuales de flujo génico entre poblaciones; véase el Capítulo 5), se diseñaron experimentos de detección por depredadores (humanos) orientados visualmente, con objeto de averiguar el posible papel de la coloración dorsal como estrategia antidepredatoria.

Material y métodos

Especie de estudio

La lagartija colilarga, *Psammodromus algirus* (Linneo, 1758) es un lacértido de mediano tamaño (LCC en el adulto: 60-90 mm) heliotérmico y ampliamente distribuido que vive en zonas de bosque y matorral de la Península Ibérica, la región costera suroriental de Francia y el Noroeste de África (Arnold 1987; Díaz y Carrascal 1991). Los datos moleculares muestran que *P. algirus* está formado por dos linajes mitocondriales recíprocamente monofiléticos (Carranza et al. 2006, Verdú-Ricoy et al. 2010, Fitze et al. 2011): un linaje oriental confinado a la Península Ibérica, compuesto por tres clados principales (un clado suroriental al que hemos denominado E1, un clado ampliamente distribuido por la mitad oriental o E2, y un clado central o E3) y un linaje

occidental presente en la Península Ibérica y en el Norte de África, cuyos principales clados peninsulares se han denominado W1 (sudoccidental) y W2 (noroccidental; véase el Capítulo 5). Además, y a pesar de que hemos encontrado sólo una población con haplotipos de ambos linajes (Villuercas, Capítulo 5), los análisis con marcadores nucleares indican que en el centro de la Península existen importantes niveles de flujo entre el clado central del linaje oriental, E3, y los clados occidentales W1 y W2.

Variación fenotípica

Las lagartijas se capturaron durante los periodos de actividad de 2006 y 2008-2012, en la mayoría de los casos aprovechando el muestreo realizado para la obtención de tejidos de cara a los estudios genéticos descritos en el Capítulo 5. Sin embargo, la obtención de datos fenotípicos y de material genético no se realizaron necesariamente durante el mismo periodo de tiempo o sobre los mismos individuos, por lo que algunas de las poblaciones indicadas en la Tabla 5.1 del capítulo anterior no pudieron ser caracterizadas fenotípicamente, y por tanto no se incluyeron en este estudio. Además, se optó también por excluir aquellas poblaciones con escaso tamaño de muestra ($N < 5$). En total, se consiguieron reunir datos fenotípicos de 23 poblaciones (Tabla 6.1). Las lagartijas se capturaron con la mano o mediante un lazo, tras lo cual fueron clasificadas según el sexo y/o la edad (como machos adultos, hembras adultas o lagartijas inmaduras de sexo desconocido) y asignadas a un patrón de coloración en base a la presencia o ausencia de una línea oscura medio-dorsal (Figura 6.1). Aunque algunos individuos clasificados como rayados mostraron un patrón leve de rayas dorsales, en la mayoría de

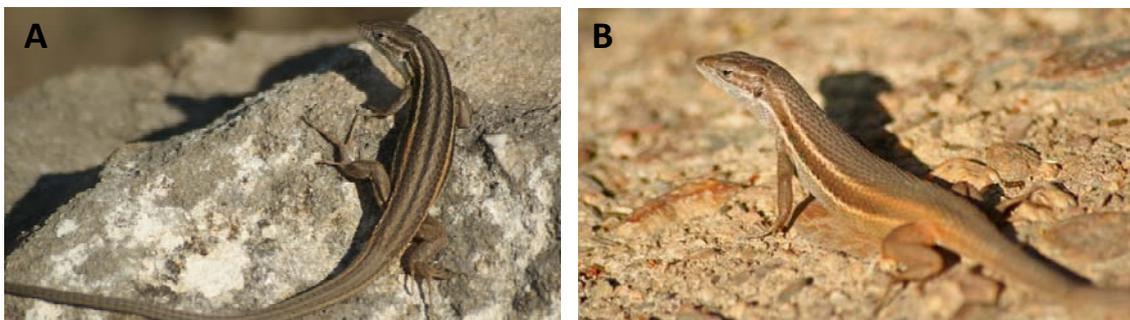


Figura 6.1. Fenotipos rayado (A) y no rayado (B) de lagartija colilarga *Psammodromus algirus*. Véase el texto para más detalles. #

los casos las lagartijas rayadas no solo mostraron una raya medio-dorsal evidente, sino una banda adicional en cada lado del dorso. En cambio, las lagartijas no rayadas solo

mostraron dos bandas pálidas en los costados que son características de esta especie (Figura 6.1). Los análisis preliminares indicaron que las proporciones de lagartijas rayadas no mostraron diferencias significativas entre categorías de sexo o edad (todas las $P > 0.2$), por lo que todos los datos se combinaron en los análisis estadísticos.

Variación genética de las poblaciones muestreadas

Como se ha indicado en el apartado anterior, se obtuvieron secuencias de ADN mitocondrial para todas las poblaciones utilizadas en este estudio (véase el Capítulo 5). Para los experimentos de detección de las lagartijas en ambientes naturales se capturaron individuos de cinco poblaciones (Figura 6.2) para las que se dispone de haplotipos mitocondriales y, para cuatro de ellas, de información sobre microsátelites. Así,

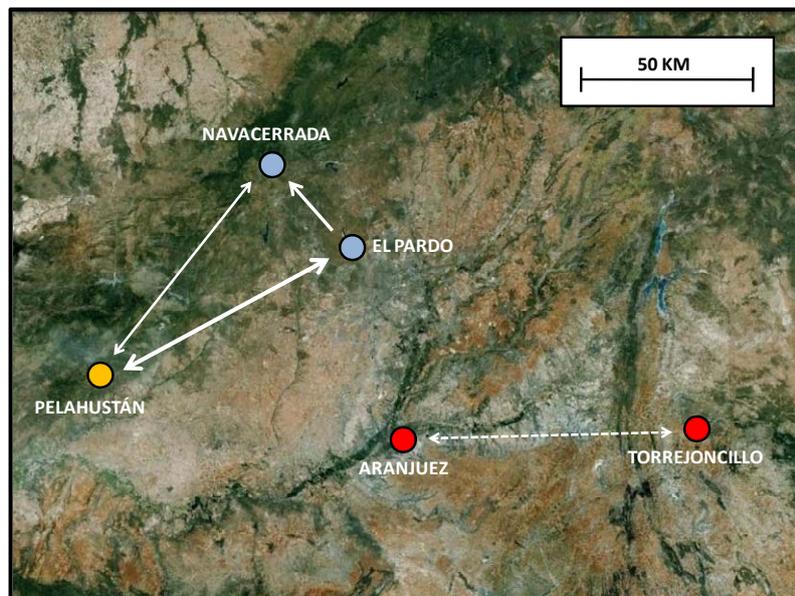


Figura 6.2. Mapa geográfico de las cinco localidades en las que se realizaron las fotografías para estimar los tiempos de detección de lagartijas con fenotipo rayado y no rayado. Los colores se refieren al clado mitocondrial (azul: W2; rojo: E2; naranja: E3) y las líneas representan los niveles aproximados de flujo entre las poblaciones en base a los resultados de la Tabla 5.5 del capítulo anterior (el flujo entre las poblaciones de Aranjuez y Torrejoncillo no se ha medido, véase el texto para más detalles). El patrón “rayado” de coloración dorsal presenta frecuencias superiores al 95% en las poblaciones de Aranjuez y Torrejoncillo, mientras que no supera el 20% en Navacerrada, El Pardo y Pelahustán.

empleamos dos localidades del grupo W2 del linaje occidental (Navacerrada y El Pardo), dos poblaciones del clado oriental E2 (Aranjuez y Torrejoncillo del Rey) y una población del clado E3 del linaje oriental (Pelahustán). A pesar de sus diferentes

Población	Latitud (°N)	Longitud (°E)	Haplotipos de mtDNA	Clado(s)	N (mtDNA)	N (fenotipos)
1.- Abrucena	37.119	- 2.812	29, 30, 31	E1 + E2	13	21
2.- Aranjuez	40.016	- 3.586	17, 18	E2	8	42
3.- Brihuega	40.766	- 2.930	18	E2	10	12
4.- Hoces del Cabriel	39.542	- 1.518	18, 21, 22, 23, 24	E2	15	20
5.- San Martín de la Vega	40.187	- 3.544	18	E2	7	9
6.- Torrejuncillo del Rey	40.035	- 2.599	18	E2	9	21
7.- Vellisca	40.139	- 2.813	18, 28	E2	6	6
8.- Villares del Saz	39.856	- 2.541	18, 27	E2	8	8
9.- Villatobas	39.839	- 3.259	18	E2	5	5
10.- Malpica de Tajo	39.912	- 4.545	42, 50, 53, 54	E3	8	8
11.- Monte de Batres	40.224	- 3.938	42, 44, 45	E3	11	11
12.- Noez	39.747	- 4.197	42, 57, 58	E3	10	10
13.- Pelahustán	40.180	- 4.607	42, 43	E3	10	31
14.- Puerto Lápice	39.328	- 3.490	59, 60	E3	5	5
15.- Talavera de la Reina	39.936	- 4.820	42, 46, 47, 48, 49	E3	7	7
16.- Villarejo de Montalbán	39.760	- 4.568	42, 50, 51, 52	E3	11	11
17.- Sierra de las Villuercas	39.468	- 5.341	11, 42	E3 + W1	16	20
18.- Helechosa de los Montes	39.314	- 4.900	11	W1	5	5
19.- Pallarés	38.057	- 6.184	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	W1 + W2	12	23
20.- Aldea del Fresno	40.330	- 4.244	1	W2	8	8
21.- Cabañas de Tera	42.011	-6.056	1, 8	W2	13	23
22.- El Pardo	40.511	-3.755	1,4,5	W2	9	35
23.- Navacerrada	40.726	- 4.023	1,2,3	W2	9	36

#

Tabla 6.1. Poblaciones para las que se dispone de información sobre los patrones de coloración dorsal (frecuencia de individuos rayados y no rayados; véase el texto para más detalles). Se muestran la latitud y la longitud, los clados y haplotipos presentes según los códigos de la Figura 5.2, y los tamaños de muestra para los análisis de mtADN y coloración.

orígenes filogeográficos, los análisis con microsatélites (Capítulo 5) evidencian que las poblaciones de W2 y E3 situadas al sur del Sistema Central mantienen considerables niveles de flujo génico, favorecidos por un corredor de hábitat continuo, mientras que la población de Aranjuez permanece aislada de Navacerrada, El Pardo y Pelahustán (véanse la Figura 5.4 y Tabla 5.5 del capítulo anterior). A pesar de no contar con datos de microsatélites para la localidad de Torrejoncillo, sí parece probable que esta población mantenga un flujo apreciable con Aranjuez, en base a varios tipos de evidencias. En primer lugar, no existen discontinuidades importantes de hábitat entre ambas poblaciones a lo largo de la orilla sur del Tajo. En segundo lugar, las secuencias mitocondriales de las dos localidades son muy similares (con el haplotipo 18, el más representado del clado E2, siendo el predominante en Aranjuez y el único presente en Torrejoncillo; véase la Tabla 5.1), por lo que la distancia genética entre ambas es reducida (con un valor de $F_{ST} = 0.015$). Por último, el hecho de que las poblaciones de Aranjuez y Hoces del Cabriel (separadas 184 km) sean muy semejantes no sólo en su ADN mitocondrial sino también a nivel de microsatélites (véase la Figura 5.4) hace pensar que Torrejoncillo, situada geográficamente entre las dos, a 84 km de Aranjuez y a 107 km de Hoces del Cabriel, debe mantener un flujo génico apreciable con ambas.

En definitiva, contamos con 5 poblaciones, que se pueden dividir en dos grupos en base a:

- a) Su origen filogeográfico (linaje mitocondrial): Navacerrada y El Pardo vs. Pelahustán, Aranjuez y Torrejoncillo.
- b) El fenotipo predominante y, muy probablemente, la estructura genética actual estimada en base a los microsatélites: Navacerrada, El Pardo y Pelahustán vs. Aranjuez y Torrejoncillo.

Cripsis

La influencia de la coloración dorsal sobre la detectabilidad de las lagartijas se analizó en dos experimentos. En el primero, comparamos los tiempos de detección empleados por depredadores simulados (observadores humanos) sobre lagartijas de dos poblaciones orientales (E2), en las que la frecuencia del fenotipo rayado es superior al 95% (Aranjuez y Torrejoncillo; véase Tabla 6.1), y lagartijas de dos poblaciones occidentales (W2), en las que la frecuencia de individuos rayados es inferior al 20%

(Navacerrada y El Pardo). En mayo de 2010 se capturaron en cada una de las cuatro localidades tres machos adultos, uno de tamaño corporal pequeño (LCC < 70 mm), otro mediano (LCC entre 70 y 75 mm) y otro grande (LCC > 75 mm) para evitar el sesgo potencial debido a variaciones en la detectabilidad causadas por diferencias en el tamaño corporal. Todas las lagartijas capturadas de las poblaciones orientales fueron rayadas, y todas las de poblaciones occidentales fueron no rayadas.

Una vez en el laboratorio, las lagartijas se colocaron en terrarios (40 x 60 cm de superficie y 30 cm de altura) rellenos con tierra humedecida recubierta de hojarasca. Se utilizó una bombilla de 60 W para crear un gradiente fototérmico (entre 25-50 °C) que permitiera la termorregulación dentro del rango preferido de temperaturas (Díaz et al. 2006). Tanto el alimento (grillos, *Acheta domesticus* y larvas de tenebrio, *Tenebrio molitor*) como el agua estuvieron disponibles *ad libitum*.



Figura 6.3. Fotografías de un ejemplar no rayado en El Pardo (a la izquierda) y de otro rayado en Aranjuez (a la derecha) que se cuentan entre las utilizadas para medir los tiempos de detección por observadores humanos. El círculo pequeño representa la localización del animal (anestesiado por frío) a la escala original de la presentación y el círculo grande es una ampliación mostrando los detalles.

Tras una semana de aclimatación, todos los individuos fueron llevados a las cuatro localidades para realizar fotografías que pudieran luego servir para estimar los tiempos de detección de las lagartijas por observadores humanos. Cada sitio se visitó en un día diferente. Las lagartijas fueron anestesiadas con frío para prevenir posibles escapes mediante el transporte en neveras portátiles. Para medir los tiempos de detección en humanos se emplearon fotografías de lagartijas colocadas de una forma realista dentro de parches de vegetación escogidos aleatoriamente (Figura 6.3). Las

lagartijas fueron fotografiadas entre las 11:00 y 13:00 horas bajo condiciones similares de tiempo atmosférico (días soleados y sin viento). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital (Sony DSC-V3) montada sobre un trípode. El diafragma varió entre f4 y f6.3 para ajustarse a las diferentes condiciones de luz en cada hábitat. El trípode se situó a una distancia de 1.65 m sobre la superficie del suelo en la que se colocó a la lagartija, y la distancia focal de la lente fue de 7 mm (equivalente a 34 mm en una cámara de 35 mm). El área de la fotografía se dividió en 6 sectores (dos sectores verticales por tres horizontales), y la posición de la lagartija se asignó de forma aleatoria a uno de esos sectores. Por lo tanto, no hubo ningún tipo de clave espacial para localizar a las lagartijas cuando las fotografías fueron presentadas a los observadores.

Los tiempos de detección por observadores humanos fueron estimados mediante la presentación de las imágenes (N = 48, tres lagartijas de cuatro poblaciones fotografiadas en cuatro localidades) en una pantalla LCD de 17 pulgadas (Dell 1708FPF) a un grupo de 12 investigadores y estudiantes de postgrado (personal del Departamento de Zoología de la Universidad Complutense of Madrid), a los que se colocó a una distancia de 50-60 cm de la pantalla y se les pidió encontrar (y confirmar mediante el cursor del ratón) la localización de las lagartijas. Las pruebas se realizaron a cada observador por separado. Los tiempos de detección se cronometraron con una precisión de ± 0.5 segundos, hasta un tiempo máximo de búsqueda de 1 minuto.

En el segundo experimento se comparó la detectabilidad de lagartijas no rayadas orientales (E3), lagartijas no rayadas occidentales (W2) y lagartijas rayadas orientales (E2) en la localidad de captura de la población de E3 (Pelahustán). Nuestro objetivo fue comprobar que el patrón de coloración de las lagartijas de E3 debería reducir su detectabilidad en su propio ambiente, por lo que sus tiempos de detección deberían ser más similares a los de las lagartijas no rayadas de W2 que a los de las lagartijas rayadas de E2. Con ese propósito, en junio de 2012 se capturaron tres machos adultos de tamaño pequeño, mediano y grande (véase más arriba) en Aranjuez (E2, rayadas), El Pardo (W2, no rayadas) y Pelahustán (E3, no rayadas). Las lagartijas fueron fotografiadas en sitios al azar siguiendo el mismo protocolo descrito más arriba. De nuevo, las nueve imágenes fueron presentadas a un grupo de 14 observadores (de los cuales ocho ya habían participado en el primer experimento), a los que se les pidió encontrar la localización de las lagartijas como se ha descrito previamente. Tras los experimentos, todos los animales fueron liberados en sus sitios de captura.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con los módulos de ANOVA / MANOVA y de Componentes de la Varianza / Modelos Mixtos de ANOVA / ANCOVA de Statistica 7.0 (Statsoft, Inc. 2004) tras haber comprobado los supuestos de los test paramétricos y en su caso haber transformado logarítmicamente las variables correspondientes.

Resultados*Variation fenotípica*

Un ANOVA unifactorial con la frecuencia de lagartijas rayadas como variable dependiente y el clado mitocondrial como factor de clasificación, considerando sólo los tres clados con un número suficientes de poblaciones para las que pudimos estimar dicha frecuencia (es decir, los clados E2, E3 y W2), mostró que las lagartijas del clado E2 eran predominantemente rayadas, mientras que las de los clados E3 y W2 eran mayoritariamente no rayadas (ANOVA con los datos de la Figura 6.4: $F_{2,16} = 75.69$, $P < 0.001$; probabilidades a posteriori de Tukey: E2 - E3 y E2 - W2: $P < 0.001$; E3 - W2: $P =$

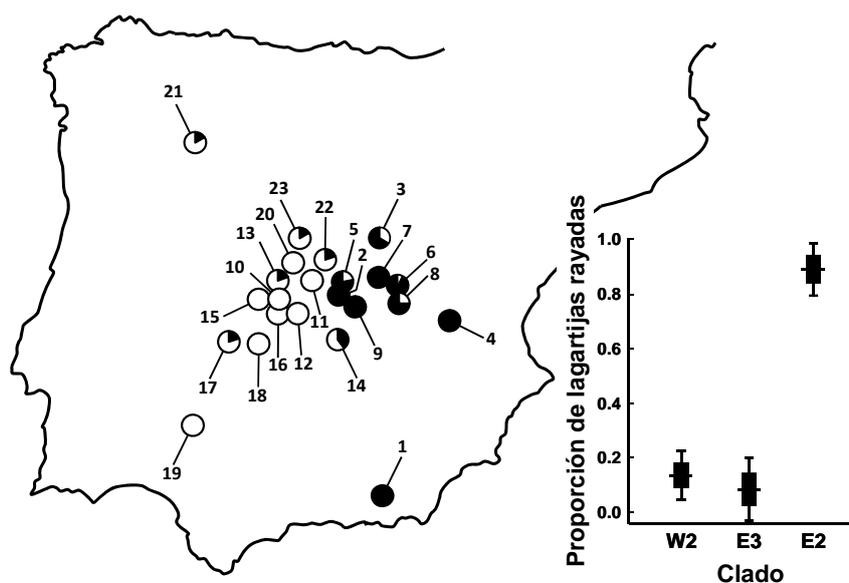


Figura 6.4. A la izquierda: frecuencia de aparición de fenotipos rayados (en negro); los números se corresponden con los de la Tabla 6.1. A la derecha: media (± 1 SE) de las frecuencias poblacionales para los clados W2 ($n = 4$ poblaciones), E3 ($n = 7$) y E2 ($n = 8$).

0.865). Observaciones puntuales de otras cuatro poblaciones (Helechosa de los Montes, con haplotipos sólo de W1, Pallarés, con una mezcla de haplotipos de W1 y W2, Abrucena, con haplotipos de E1 y E2, y Villuercas, con haplotipos de W1 y E3) nos permitieron extender los resultados de forma tentativa a los dos clados restantes. Todas las lagartijas de Helechosa de los Montes y Pallarés fueron no rayadas, mientras que todas las capturadas en Abrucena fueron rayadas. En Villuercas, la frecuencia de lagartijas rayadas fue de 0.20. Parece, por tanto, que las lagartijas del linaje occidental y del clado E3 son básicamente no rayadas, mientras que las lagartijas de E1 y E2 son rayadas; de forma global, el porcentaje medio de lagartijas rayadas fue del 90.5% para las poblaciones orientales (E1 y E2) y del 9.5% para las centrales y occidentales (E3, W1 y W2).

Cripsis

Los resultados de nuestro primer experimento, en el que la detectabilidad de las lagartijas rayadas y no rayadas se comparó en dos localizaciones orientales (E2) y dos occidentales (W2), mostraron que los tiempos de detección variaron entre los observadores humanos ($F_{11, 15.08} = 3.71$ y $P = 0.010$ en un modelo mixto de ANOVA con

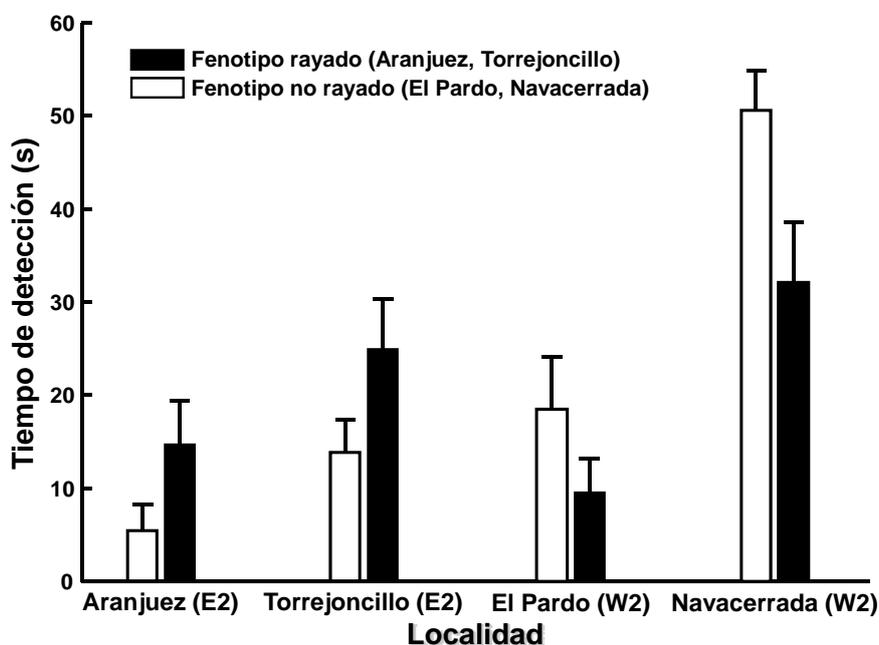


Figura 6.5. Tiempos medios de detección (+ 1 SE) para ejemplares de *P. algirus* anestesiados por frío y fotografiados en posición realista (Figura 6.3) en función de la localidad donde se realizaron las fotos y del fenotipo rayado (ejemplares procedentes de Aranjuez o Torrejoncillo) o no rayado (ejemplares procedentes de El Pardo o Navacerrada) del ejemplar que aparece en la fotografía.

el fenotipo –rayado vs. no rayado– como factor fijo y el sitio y el observador como factores aleatorios) y, lo que es más importante, que las diferencias en los tiempos de detección de las lagartijas rayadas y no rayadas mostraban signos opuestos en las localidades orientales y occidentales (interacción sitio x fenotipo: $F_{3,33} = 92.43$, $P \ll 0.001$): en las localidades orientales (Aranjuez y Torrejoncillo), las lagartijas no rayadas se detectaron más rápidamente que las rayadas, mientras que en las localidades occidentales (El Pardo y Navacerrada) las lagartijas no rayadas tuvieron tiempos de detección mayores que las rayadas (Figura 6.5).

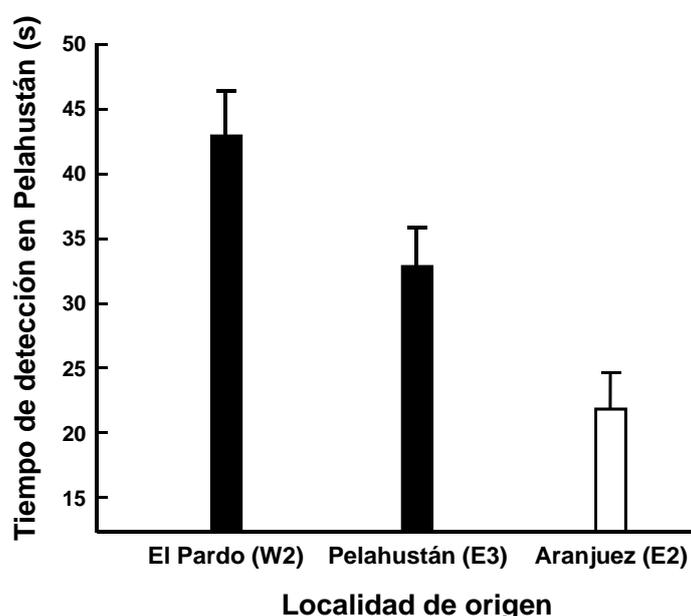


Figura 6.6. Tiempos medios de detección (+ 1 SE) en la localidad de Pelahustán (correspondiente al clado E3) para ejemplares de *P. algirus* anestesiados por frío y fotografiados en posición realista procedentes de El Pardo (W2, no rayados), el propio Pelahustán (E3, no rayados), o Aranjuez (E2, rayados).

En nuestro segundo experimento, la detectabilidad en Pelahustán mostró diferencias significativas entre las lagartijas procedentes de Aranjuez (E2), las procedentes de El Pardo (W2), y las nativas (efecto del factor población en un modelo mixto de ANOVA con el observador como factor aleatorio: $F_{2,28} = 9.73$, $P = 0.0006$, Figura 6.6). Los tiempos de detección fueron menores para las lagartijas rayadas (de Aranjuez) que para las lagartijas no rayadas, tanto nativas como procedentes de El Pardo (probabilidades a posteriori de Tukey: Aranjuez vs. Pelahustán: $P = 0.031$; Aranjuez vs. El Pardo: $P = 0.001$; Pelahustán vs. El Pardo: $P = 0.554$). Así, en Pelahustán, la localidad seleccionada del clado E3, las lagartijas no rayadas fueron más

crípticas que las rayadas, un resultado similar al obtenido previamente en las localidades occidentales.

Discusión

Los principales resultados de este capítulo son dos: la existencia de una distribución claramente bimodal de los patrones de coloración dorsal, con dos fenotipos (rayado y no rayado) que coinciden sólo en parte con la división filogeográfica entre un linaje oriental y otro occidental (Carranza et al. 2006, Fitze et al. 2011, Capítulos 2 y 5); y el hecho de que estos patrones de coloración, a juzgar por los tiempos de detección de observadores humanos acostumbrados a censar fauna silvestre, maximizan la crípsis de las lagartijas en los hábitats correspondientes a sus localidades de origen.

En relación al primer resultado, la condición rayada o no rayada tiene una distribución evidentemente bimodal en las poblaciones ibéricas de *P. algirus* (Figura 6.7): de 23 poblaciones analizadas, 13 presentaron un único fenotipo (en cinco de ellas, todos los ejemplares examinados fueron rayados, mientras que en las otras ocho ninguno lo fue), y únicamente en dos poblaciones el fenotipo más frecuente tuvo una frecuencia menor del 75%: Brihuega (localidad 3 en el mapa de la Figura 6.4), con 66%

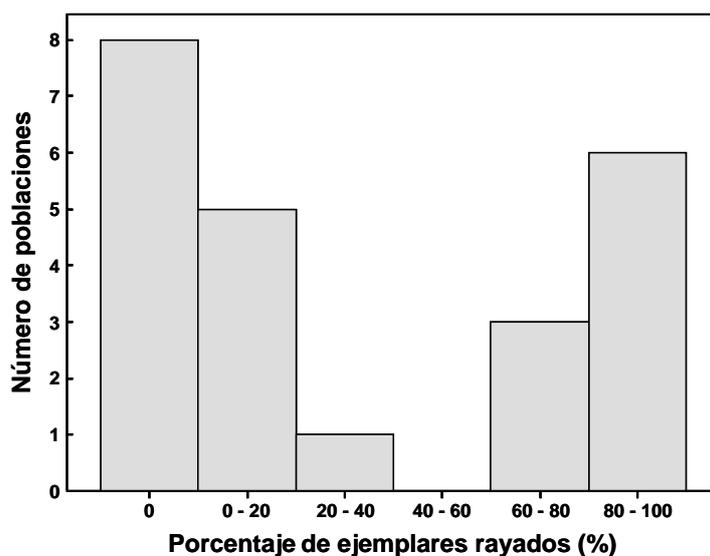


Figura 6.7. Distribución bimodal del patrón de coloración dorsal, rayado o no rayado (Figura 6.1) en las poblaciones ibéricas de *P. algirus* representadas en la Figura 6.4.

de individuos rayados, y Puerto Lápice (localidad 14), con 60% de individuos no rayados. Llama la atención el hecho de que estas dos poblaciones se sitúen precisamente en el borde occidental y oriental de sus respectivos grupos (clado E2 de la Figura 5.1 para Brihuega, y clado E3 para Puerto Lápice), cerca de la línea divisoria que recorre la Península desde Gibraltar a los Pirineos occidentales y que marca la separación entre los linajes genéticos más tempranamente diferenciados de un buen número de especies ibéricas, incluyendo las quercíneas que constituyen el hábitat preferido de *P. algirus* (Petit et al. 2002a y 2002b, Lumaret et al. 2002). Teniendo en cuenta la distribución de los bosques y orlas arbustivas forestales en el centro de la Península (Figura 6.8), las elevadas frecuencias de ambos fenotipos en estas localidades podrían por tanto ser el resultado, bien de niveles relativamente más elevados de flujo génico entre linajes colindantes (podría ser el caso de Brihuega, con más continuidad de hábitat forestal), bien de regímenes selectivos más parecidos a los del este peninsular (podría ser el caso de Puerto Lápice, más al este que otras localidades en las que el fenotipo rayado es el único presente, pero aislada de las poblaciones orientales correspondientes al filogrupo E2 por una extensa región de hábitat deforestado; véase la figura 6.8).

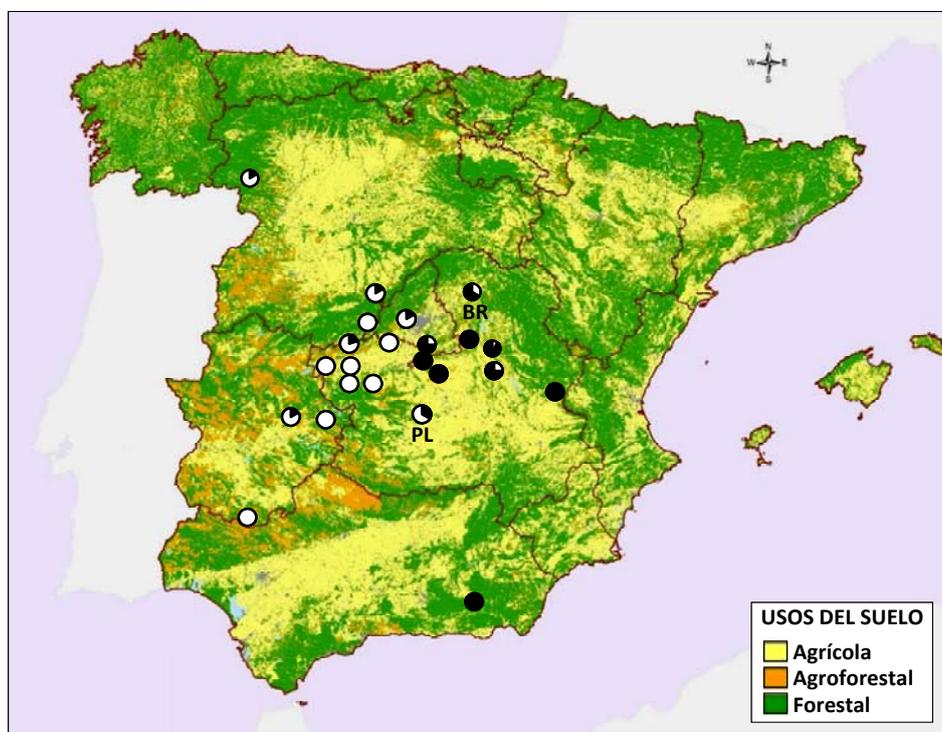


Figura 6.8. Mapa forestal de España mostrando los usos del suelo y los mismos símbolos de la Figura 6.4 (frecuencia de ejemplares rayados, en negro, en 23 poblaciones de *P. algirus*). Se indica la localización de las dos poblaciones en las que el fenotipo más frecuente no alcanza el 75% de la población: Brihuega (BR) y Puerto Lápice (PL).

Por lo que concierne al segundo resultado, sugiere con fuerza que los patrones de coloración son adaptativos en relación con las estrategias antidepredatorias (Martín 2002), puesto que la detectabilidad de los fenotipos rayados es mayor que la de los no rayados en los hábitats occidentales (Navacerrada, El Pardo y Pelahustán), tanto para las localidades ocupadas por poblaciones del linaje occidental (experimento 1) como para Pelahustán, correspondiente al clado E3 del linaje oriental (experimento 2); mientras que en los hábitats orientales (Aranjuez y Torrejuncillo) los fenotipos rayados resultan más crípticos (experimento 1). Aunque es obvio que, en sentido estricto, nuestras conclusiones quedan restringidas a la detectabilidad por depredadores humanos (Stuart-Fox et al. 2004), también lo es que experimentos similares con modelos aviares han demostrado buenas correlaciones entre los tiempos de detección por observadores humanos y el contraste en escala RGB entre los animales y su entorno, así como entre los tiempos de detección y las tasas de vigilancia de las presas potenciales (agateadores comunes *Certhia brachydactyla*; Carrascal et al. 2001). Además, se sabe que los patrones rayados producen camuflaje disruptivo cuando uno o varios de los colores implicados en el patrón de líneas coinciden con los colores del fondo (Cott 1940, Endler 1978, Merilaita 1998), tal y como sucede con las combinaciones de líneas claras y oscuras en hábitats con elevada cobertura de hierba. De hecho, simulaciones con redes neuronales ponen de manifiesto que la complejidad del fondo visual facilita la evolución del camuflaje y que los métodos basados en el grado de “*background matching*” presentan importantes limitaciones al ignorar los mecanismos y restricciones relacionados con el procesamiento de la información por los depredadores (Merilaita 2003), lo que significa que nuestro enfoque puede ser más realista que otras aproximaciones aparentemente más objetivas. De ser así, nuestras estimas de detectabilidad podrían extenderse a otros depredadores diurnos y visualmente orientados, como rapaces, cuervos o alcaudones

En cualquier caso, la importancia de la cripsis como estrategia antidepredatoria en *P. algirus* viene avalada no sólo por el elevado número de depredadores que incluyen esta especie en su dieta (Martín y López 1990, Salvador 2002), sino también por la literatura publicada que hace referencia a los efectos del riesgo de depredación sobre la asociación entre la abundancia de sus poblaciones y la cobertura de matorral bajo (Díaz y Carrascal 1991), el comportamiento termorregulador (Díaz 1992), la selección de presas y su variación estacional (Díaz y Carrascal 1993), y la mortalidad de los machos

más activos y con mayor desarrollo de la coloración sexual de la cabeza (Díaz 1993); así como al modo en que su estrategia de escape se ve afectada por la edad (Martín y López 1996), la pérdida de la cola (Salvador et al. 1995), los cambios estacionales en la cobertura de la vegetación caducifolia (Martín y López 1995), el desarrollo de la coloración nupcial en los machos dominantes (Martín y López 1990) y la gravidez en el caso de las hembras (Iraeta et al. 2010).

Otra posible explicación para la variación fenotípica observada, que constituye una alternativa no excluyente, sería que los patrones de coloración representan adaptaciones encaminadas a aumentar o disminuir la tasa de calentamiento, que como es bien sabido es mayor para las superficies con pigmentación más oscura, por lo que cabría esperar coloraciones dorsales más oscuras en los ambientes más fríos (Rosenblum 2005). Sin embargo, esta hipótesis no es consistente con nuestros datos, ya que el fenotipo rayado es más oscuro que el no rayado (Figura 6.1), a pesar de lo cual las lagartijas rayadas ocupan ambientes por lo general más cálidos que las no rayadas (véase por ejemplo la Tabla 4.1 para las poblaciones de El Pardo, Navacerrada, Aranjuez y Torrejuncillo; el promedio de las temperaturas de marzo a octubre es de 15.7 °C para las poblaciones no rayadas frente a 17.4 °C para las rayadas).

Así, los resultados de este capítulo suministran un trasfondo adaptativo, relacionado con la estrategia antidepredatoria (crisis), a los patrones de flujo y diferenciación genética descritos en el capítulo anterior: los clados W1 y W2 del linaje occidental, y el clado E3 del linaje oriental, que a juzgar por los microsatélites nucleares intercambian genes a lo largo de los valles del Tajo y el Guadiana, y que aparecen en sintopía (W1 y E3) en la población “híbrida” de Villuercas, comparten el mismo fenotipo básicamente no rayado. En la meseta Sur, estas poblaciones no rayadas estarían genéticamente aisladas de las poblaciones orientales rayadas (del clado E2) por las amplias extensiones deforestadas de la llanura castellano-manchega (Figura 6.8). De hecho, si se analizan mediante AMOVAs (Excoffier et al. 2005; para más detalles, véase el Capítulo 5) los datos de microsatélites para las poblaciones de El Pardo, Pelahustán y Aranjuez, clasificándolas en función del linaje de ADN mitocondrial (oriental [Aranjuez y Pelahustán] vs. occidental [El Pardo]), no se encuentra ningún indicio de estructura genética entre grupos (F_{ST} y $R_{ST} = 0$, $P > 0.6$ en ambos casos). En cambio, si se clasifican las poblaciones en función del patrón de coloración dorsal dominante en cada una de ellas (rayados [Aranjuez] vs. no rayados [Pelahustán y El

Pardo]), se obtienen diferencias significativas ($F_{ST} = 0.0247$, $P = 0.0176$; $R_{ST} = 0.2113$, $P = 0.0045$) que reflejan el flujo génico entre Pelahustán (E3) y El Pardo (W2) y el aislamiento de ambas localidades respecto a Aranjuez (E2). Por tanto, en la zona de contacto del centro de la Península los marcadores nucleares apoyan el mismo esquema de aislamiento y diferenciación que la variación cromática relacionada con la cripsis.

Es interesante especular sobre la base genética de las diferencias fenotípicas encontradas. Aunque los genes implicados pueden ser muchos, e incluso tratándose de un mismo gen sus efectos funcionales pueden ser varios (Manceau et al. 2010, Rosenblum et al. 2010), debe tratarse de productos relacionados con la regulación del color de la piel. Un buen candidato es el *Mc1r* (Rosenblum et al. 2004, 2010), que codifica para una proteína transmembranosa de las células pigmentarias, el receptor 1 de melanotropinas, cuya activación en vertebrados ectotermos (peces, anfibios y reptiles), a cargo de hormonas hipofisarias como la corticotropina o las distintas clases de melanotropinas, causa la dispersión de los melanosomas rellenos de eumelanina en el interior de los melanóforos, oscureciendo la piel del animal en respuesta a cambios fisiológicos o ambientales (Logan et al. 2006); el *Mc1r* se considera, por tanto, un mediador clave en los procesos de convergencia adaptativa relacionados con la cripsis (Rosenblum 2006, Steiner et al. 2009, Manceau et al. 2010, Rosenblum et al. 2010, Vignieri et al. 2010). Por otra parte, los cambios de coloración a más largo plazo, tanto ontogenéticos como filogenéticos, podrían estar además relacionados con cambios en la tasa de producción de melanina (Rosenblum 2005).

Sea como fuere, la hipótesis que planteamos, y que debería verse corroborada por experimentos de cría en ambiente común (Rosenblum 2005), es que la herencia de la variación genética subyacente y su expresión adaptativa pueden ser descritos mediante los modelos clásicos de la genética cuantitativa (Falconer y Mackay 1996), en los que los efectos combinados de uno o varios genes y de los ambientes en los que se expresan dan lugar a una distribución continua de los valores fenotípicos. Este tipo de modelos ofrecen la ventaja de que la selección de una mayor intensidad en la manifestación del rasgo (por ejemplo un mayor contraste en el patrón de rayas del dorso y los costados) puede dar lugar, mediante procesos de asimilación genética (Waddington 1952, 1953; Pigliucci et al. 2006), a un aumento de la frecuencia de aparición del rasgo (por ejemplo un mayor número de ejemplares con línea oscura mediodorsal), sin descartar el posible papel de la plasticidad fenotípica en la mayor o

menor expresión del carácter (West-Eberhard 2003, Pigliucci et al. 2006).

¿Qué tipo de evidencias apoyan esta hipótesis? En primer lugar, y a pesar de lo sencillo que resulta clasificar a los individuos en función de la presencia/ausencia de la línea oscura mediodorsal y de la distribución claramente bimodal del patrón rayado en las poblaciones ibéricas (Figura 6.7), la variación del patrón de coloración es gradual, con ejemplares en los que dicha línea va resultando cada vez más tenue (véase la Figura 6.9 y compárese con la Figura 6.1); en consecuencia, puede haber un porcentaje más o menos pequeño de individuos con el fenotipo “alternativo” en localidades bastante más al este o al oeste de lo que a priori cabría esperar (Figuras 6.4 y 6.8). Probablemente este carácter gradual sea la causa de que nadie haya reparado antes en la clara segregación longitudinal de los fenotipos rayado y no rayado, aunque en este sentido también hay que señalar la falta de muestreos con una cobertura geográfica lo suficientemente extensa (véase no obstante Carretero 2002, que clasifica los ejemplares de tres poblaciones costeras del NE ibérico en tres categorías según el desarrollo de la línea vertebral oscura: ausente, débil o marcada).



Figura 6.9. Ejemplares rayados de *P. algirus*, procedentes de Granada (arriba) y Marruecos (abajo), con un patrón tenue de línea oscura mediodorsal.

En segundo lugar, la frecuencia de individuos rayados en las poblaciones en las que existe dicho fenotipo (n° de individuos rayados / n° total de individuos) se correlaciona inversamente con la proporción de individuos rayados en los que la línea mediodorsal oscura es tenue o muy tenue (n° de individuos con línea vertebral tenue / n°

de individuos rayados) ($r = -0.874$, $n = 15$, $P = 0.00002$; Figura 6.10). Dicho de otro modo: cuanto más intenso es el desarrollo del carácter “patrón de coloración rayado” en los individuos que lo presentan, mayor es la frecuencia de dicho carácter en la población. Este resultado es consistente con las predicciones de un modelo de variación genética continua con un umbral de expresión para la línea oscura mediodorsal que permite clasificar a los individuos de forma dicotómica en función de la presencia-ausencia de dicha línea. De esta forma, la selección direccional que según nuestra hipótesis tiende a optimizar la capacidad de crípsis en cada población (Heatwole 1968, Forsman y Shine 1995b, Stuart-Fox et al. 2004, Rosenblum 2006), hace que la mayoría de las poblaciones tengan, o bien muchos individuos rayados con un patrón contrastado de líneas claras y oscuras (como en la Figura 6.1 A), o bien pocos o ningún individuo rayado (Figura 6.1 B), en cuyo caso el patrón de rayas en los pocos ejemplares que lo presentan tiende a ser tenue y poco contrastado (Figura 6.8).

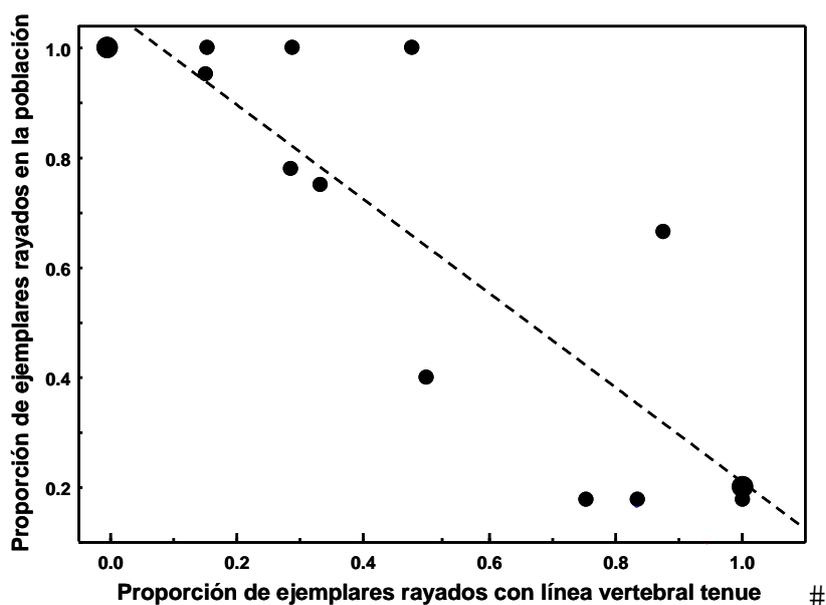


Figura 6.10. Correlación entre la frecuencia de individuos rayados en las poblaciones en las que dicha frecuencia es > 0 (eje Y) y la proporción de individuos rayados en los que la línea mediodorsal oscura es tenue o muy tenue, como en la Figura 6.9 (eje X). Los puntos gruesos representan dos poblaciones.

En resumidas cuentas, los resultados de este capítulo indican una posible barrera ecológica en el centro de la Península que separaría las poblaciones occidentales no rayadas, de los clados mitocondriales W2 y E3, de las poblaciones orientales rayadas correspondientes al clado E2; la variación de la coloración dorsal en torno a la barrera

sería adaptativa y tendría que ver con la importancia de la crípsis como estrategia antidepredatoria (Martín 2002). Los datos de marcadores nucleares (microsatélites; véase el Capítulo 5), la discontinuidad de hábitat representada por el área metropolitana de Madrid y las extensiones deforestadas del valle del Tajo y la meseta Sur y, sobre todo, la ausencia de poblaciones híbridas tras haber realizado un muestreo razonablemente completo en dirección este-oeste a ambos lados de la zona de contacto (Figura 6.8), indican que las poblaciones a ambos lados de esa barrera podrían estar, de hecho, reproductivamente aisladas (nótese que, como ya se discutió en el Capítulo 5, sí se han detectado poblaciones híbridas para las otras zonas de contacto entre filogrupos, destacando en particular la presencia sintópica de haplotipos W1 y E3 en una localidad tan occidental como Villuercas; véase la Figura 6.4). Aunque las posibles repercusiones taxonómicas del incipiente proceso de especiación que proponemos quedan pendientes de un examen mucho más detenido de la variación fenotípica entre las poblaciones implicadas (morfometría, lepidosis, comportamiento, selección de hábitat, señales químicas, etc.), podemos anticipar algunas hipótesis relacionadas con la coloración dorsal.

En primer lugar, la diferencia entre los ambientes que maximizan la crípsis para cada uno de los fenotipos crearía las condiciones requeridas para que la selección pueda reforzar el aislamiento promoviendo el emparejamiento selectivo (“especiación ecológica”: Sætre et al. 1997, Barluenga et al. 2006, Rosenblum 2006, Reynolds y Fitzpatrick 2007, Robertson y Rosenblum 2009, Rosenblum y Harmon 2010; para sendas revisiones del papel del refuerzo en la especiación, veáanse Servedio y Noor 2003 y Coyne y Orr 2004); la distribución bimodal de la frecuencia de fenotipos rayados y su correlación negativa con la intensidad de la línea vertebral oscura apoyarían la idea de que los fenotipos “intermedios” están peor adaptados que los fenotipos “puros”.

En segundo lugar, el patrón de coloración suministra de por sí una señal visual en la que basar el emparejamiento selectivo. Además, hay diferencias, que podrían obedecer a efectos pleiotrópicos (Reynolds y Fitzpatrick 2007, Robertson y Rosenblum 2009 y 2010), no sólo en la coloración dorsal sino también en el desarrollo de la coloración sexual de la cabeza, mucho más acentuado en los machos occidentales (W2) que en los orientales (E2) (Carretero 2002 y observación personal). Sería interesante comprobar en qué medida las secreciones de los poros femorales, fundamentales para la comunicación química en esta especie (López et al. 2003, Martín et al. 2007), difieren

entre poblaciones de distinto origen (por ejemplo W2, E2 y E3). Un experimento preliminar en el que se ofreció a hembras de El Pardo (W2), Aranjuez (E2) y Pelahustán (E3) bastoncillos de algodón impregnados con las secreciones femorales de machos de esas mismas localidades, y se contó durante un minuto el número de protrusiones linguales, permitió detectar una tendencia marginalmente significativa a que las hembras de Aranjuez llevasen a cabo más protrusiones, sobre todo frente a olores de El Pardo y Pelahustán más que de su propia población; se trata, por tanto, de una línea de investigación prometedora para futuros trabajos. En cualquier caso, nuestros resultados sugieren un posible vínculo entre la viabilidad ecológica, la diferenciación genética y el emparejamiento selectivo, que sería una pieza clave para profundizar en la comprensión de las causas que han originado y mantienen la diversidad genética y fenotípica en el taxón más abundante, ubicuo y ampliamente distribuido de la fauna ibérica de reptiles.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

La historia filogeográfica de las lagartijas colilargas en el Mediterráneo occidental, basada sobre todo en marcadores mitocondriales, ofrece un panorama cuyas líneas generales se han ido consolidando a lo largo de la última década (véanse Carranza et al. 2006, Pina Martins 2007, Verdú-Ricoy et al. 2010 –que recoge los resultados del Capítulo 2 de esta memoria– y Fitze et al. 2011). Todos estos trabajos coinciden en señalar que la divergencia intraespecífica más profunda obedece a la antigua división entre un linaje oriental y un linaje occidental (datada entre los 3.6 y 3 Ma. según Carranza et al. 2006 y Fitze et al. 2011, respectivamente). Además, todos ellos indican también que las poblaciones norteafricanas están más emparentadas con el linaje occidental que con el oriental. Sin embargo, hay menos acuerdo a la hora de establecer la división de estos linajes en clados y subclados, así como en torno al momento y forma en que tuvo lugar la colonización del continente africano (Carranza et al. 2006, Pina Martins 2007). En cualquier caso, la existencia de los dos linajes es el resultado más claro que emerge de los análisis filogeográficos con *P. algirus*, y constituye el hilo conductor de las investigaciones sobre el origen y mantenimiento de la diversidad fenotípica interpoblacional contenidas en esta memoria, proporcionando un contexto filogenético explícito a las posibles diferencias entre linajes o, alternativamente, favoreciendo la generalización de aquellas características que sean similares en ambos.

Los análisis detallados en el Capítulo 2, que incluyen muestras de Carranza et al. (2006), el holotipo y un paratipo de *P. jeanneae* y dos topotipos de *P. manuelae* (Busack et al. 2006), encaminados a esclarecer la sistemática de las lagartijas colilargas ibéricas, demuestran que estos dos taxones descritos por Busack et al. (2006) constituyen ramas recíprocamente monofiléticas dentro del conjunto de poblaciones ibéricas del linaje occidental. De hecho, las secuencias mitocondriales sitúan a *P. jeanneae* y *P. manuelae* respectivamente dentro de los clados suroccidental (W1) y noroccidental (W2) descritos con detalle en el Capítulo 5 (véanse las Figuras 5.1 y 5.2 de esta memoria, y también Fitze et al. 2011), dos filogrupos que iniciaron su diferenciación hace aproximadamente 1 Ma (Carranza et al. 2006, Fitze et al. 2011) y que presentan un escaso grado de divergencia genética en comparación con la existente entre los linajes, e incluso entre los distintos clados del linaje oriental (véase la Figura 5.2). Además, la distribución geográfica de ambos filogrupos, que coincide

ampliamente en el SO peninsular (Carranza et al. 2006, Verdú-Ricoy et al. 2010, Fitze et al. 2011 y Capítulo 5 de esta memoria) y el hallazgo de una población (Pallarés) que incluye haplotipos de ambos clados (véase la Tabla 5.1) suponen evidencias de que los clados W1 y W2 (es decir, *P. jeanneae* y *P. manulae*) mantienen un considerable flujo génico entre sí, muestra inequívoca de que no han completado el aislamiento reproductivo. Además, las mediciones morfológicas realizadas por Busack et al. (2006), ponen de manifiesto que, tanto en el caso de los machos como en el de las hembras, *P. jeanneae* y *P. manulae* se solapan entre sí para la mayoría de los caracteres (véanse las Tablas 1 y 2 de Busack et al. 2006). Así mismo, desde el punto de vista de la coloración dorsal que se aborda en el Capítulo 6, tanto *P. jeanneae* como *P. manulae* carecen de línea negra medio-dorsal (véase la Figura 3 de Busack et al. 2006), lo que coincide con el patrón general de diseño dorsal del linaje occidental.

En definitiva, la información filogeográfica y morfológica de *P. jeanneae* y *P. manulae* invita a pensar que su descripción como especies carece de justificación. Sin embargo, eso no excluye la posibilidad de que *P. algirus* pueda constituir, en realidad, más de una especie. De hecho, los estudios de diversidad fenotípica de esta memoria sugieren que las poblaciones ibéricas de lagartija colilarga se podrían agrupar en dos conjuntos fenotípicos muy generalizados y extendidos, definidos en base a las características reproductivas (Capítulos 3 y 4) y, sobre todo, al patrón de coloración dorsal (Capítulo 6); además, estos dos grupos muestran cierto grado de aislamiento genético (Capítulo 5), por lo menos en el centro de la Península. En cualquier caso, es necesario disponer de evidencias más sólidas sobre diferenciación genética (basadas por ejemplo en marcadores nucleares; Godinho et al. 2008), morfológica (foliosis, colorimetría, morfometría geométrica, etc.), comportamental (cortejo, señales químicas, emparejamiento selectivo, etc.) y, sobre todo, niveles de flujo génico / aislamiento reproductivo, especialmente en las poblaciones de Cádiz y Málaga, antes de tomar decisiones taxonómicas precipitadas.

Los Capítulos 3 y 4 abordan el estudio comparado, a nivel interpoblacional, de las estrategias vitales de las lagartijas colilargas ibéricas, un tema que ya ha sido objeto de numerosos trabajos centrados en las diferencias entre poblaciones filogenéticamente muy próximas pero adaptadas a ambientes distintos (como es el caso de Navacerrada y El Pardo, pertenecientes ambas al clado W2 del linaje occidental; Iraeta et al. 2006, 2008, 2013) o en las diferentes adaptaciones de una población central (El Pardo, del

clado W2) y otra periférica (Lerma, del clado E2) situada 200 km al norte de la primera y próxima al límite septentrional del área de distribución ibérica de la especie (Díaz et al. 2007). Por tanto, los datos genéticos vienen a confirmar, en el primer caso (Navacerrada y El Pardo, con un exiguo grado de divergencia tanto para el ADN mitocondrial como para los microsatélites nucleares; véase el Capítulo 5), la interpretación de los resultados de esos trabajos como causados por la variación de las condiciones ambientales a lo largo del gradiente altitudinal que separa ambas poblaciones. En el segundo caso, sin embargo, los resultados de Díaz et al. (2007) deberían ser reinterpretados a la luz de los nuevos datos genéticos; en particular, los tiempos de incubación relativamente más cortos en la población de Lerma parecen tener que ver no sólo con la adaptación al descenso de las temperaturas que tiene lugar al aumentar la latitud, sino también con el hecho de que dicha población pertenece al linaje oriental (y más concretamente al clado E2) que, a igual clima, presenta tiempos de incubación menores que el linaje occidental (Capítulo 3 y discusión del Capítulo 5). Lerma es, de hecho, la población con tiempos de incubación más cortos de las catorce que se comparan en la Figura 3.3, lo que abre perspectivas interesantes acerca de los procesos que pueden estar limitando la expansión septentrional de la especie (puede ocurrir, por ejemplo, que existan restricciones evolutivas a la ulterior retención de los huevos oviductales en latitudes más norteñas, y que estas restricciones alarguen la incubación extrauterina hasta el punto de impedir la eclosión de los juveniles antes de la llegada de la estación fría). Desde esta perspectiva, los resultados del Capítulo 3 aportan datos empíricos que podrían ser relevantes para la discusión de los factores que limitan y dan forma al área de distribución de las especies (Brown et al. 1996, Gaston 2003 y 2009, Sexton et al. 2009).

Por otra parte, los Capítulos 3 y 4 se complementan en el sentido de que el primero cubre una mayor extensión geográfica y un mayor número de clados de ambos linajes (W1, W2, E2, E3 y puede que E1), por lo que su validez externa es mayor, aunque su carácter correlacional limita su validez interna. El Capítulo 4, sin embargo, es en gran medida experimental (su validez interna es mayor), pero sus resultados se refieren a sólo cuatro poblaciones de los linajes W2 y E2 (su validez externa es menor, aunque se ha tratado de paliar esta limitación analizando los datos con modelos mixtos de ANOVA en los que las diferencias entre puestas y poblaciones se atribuyen a factores de efectos aleatorios). También es obvio que algunas de las diferencias entre los

resultados de ambos capítulos son atribuibles a sus distintas escalas (Levin 1992) y, en consecuencia, a sus distintos tamaños muestrales (número de hembras por población y número de poblaciones por linaje) y niveles de potencia asociados (Ruxton y Colegreave 2010). Así por ejemplo, el mayor tiempo de incubación de las poblaciones del linaje occidental, a igualdad de condiciones climáticas, es uno de los resultados más claros del Capítulo 3, mientras que el mismo efecto no llega a ser significativo en el Capítulo 4, además de por el escaso tamaño de muestra, porque a esa escala se impone el componente de variación entre poblaciones debido a los efectos del clima. Sin embargo, no deja de ser cierto que estos dos capítulos también permiten extraer algunas conclusiones generales, entre las que cabe destacar las siguientes:

1. La inversión reproductiva (tamaño y peso de la puesta) depende en gran medida del tamaño corporal de las hembras, asociado, tanto a nivel de poblaciones (Capítulos 3 y 4) como de linajes (Capítulo 4), a un componente climático de precipitación, que es probablemente un correlato de la productividad (Brandt y Navas 2011).
2. Los efectos de las condiciones de incubación (temperatura y humedad) sobre el fenotipo de los juveniles (aunque no sobre la tasa de eclosión; véase más adelante) pueden generalizarse, al menos, a los clados W2 y E2, a juzgar por el tamaño (*effect size*) y la falta de significación de las interacciones entre ambos tipos de efectos; parece, por tanto, que los efectos perjudiciales de la incubación a bajas temperaturas (24 °C), cuya expresión fenotípica (en la tasa de crecimiento y en el tamaño corporal resultante) se va desarrollando a lo largo de los primeros meses de vida, constituyen un carácter general de las poblaciones ibéricas de *P. algirus*.
3. El hecho de que la variación interpoblacional asociada a gradientes bioclimáticos de productividad, junto a los resultados de experimentos previos de trasplante recíproco (Iraeta et al. 2006 y 2008), sea la fuente principal de variación en las estrategias reproductivas de esta especie, lleva a postular que la plasticidad fenotípica es un factor decisivo a la hora de comprender el origen y mantenimiento de dicha variación (Niewiarowski y Roosenburg 1993, Sinervo y Adolph 1994, Shine y Harlow 1996, Sorci et al. 1996, Lorenzon et al. 2001).

Por último, los Capítulos 5 y 6 retoman la filogeografía y estructura genética actual de un buen número de poblaciones ibéricas y la interpretan en relación con la variación del patrón de coloración dorsal, un rasgo fenotípico relevante desde el punto

de vista adaptativo. El Capítulo 5 apoya el esquema de relaciones entre linajes (occidental, W, y oriental, E) y clados (W1, sudoccidental; W2, noroccidental; E1, sudoriental; E2, oriental, ampliamente extendido por la mitad este de la Península; y E3, central) obtenido en el Capítulo 2 [(W1,W2),(E1(E2,E3))], y ofrece además datos suficientes para especular acerca de las vicisitudes históricas que han podido experimentar las poblaciones ibéricas de *P. algirus*. Así, los análisis basados en marcadores mitocondriales (índices de diversidad, topología de la red de haplotipos, análisis de *mismatch distribution* y estimas de R_2) indican que los clados del norte (W2, E2 y E3), pero no los del sur (E1 y W1), tienen la estructura típica de poblaciones en expansión demográfica, lo que resulta consistente con la existencia de múltiples refugios durante los máximos glaciares del Pleistoceno (Gómez y Lunt 2007). La contracción en refugios distintos habría favorecido la diferenciación de los clados, y las expansiones interglaciares, incluida la actual, estarían promoviendo el contacto secundario entre ellos. De hecho, los microsátélites de una submuestra de nueve poblaciones revelan un patrón distinto al del ADN mitocondrial, con un grupo de poblaciones en el centro de la Península que presentan elevados niveles de flujo entre ellas a pesar de tratarse de poblaciones cuyos haplotipos pueden ser tanto occidentales (W2) como orientales (E3). Además, este grupo incluye la única población “híbrida” entre los linajes oriental y occidental que hemos detectado en nuestros muestreos (Villuercas, con presencia sintópica de haplotipos de W1 y E3). Nuestros resultados, por tanto, además de abrir interesantes perspectivas para el futuro (relacionadas, por ejemplo, con la zona de discordancia cito-nuclear del centro de la Península, en la que se mantiene la diferenciación a nivel de marcadores maternos que no recombinan, pero no a nivel de marcadores recombinantes de herencia biparental; Lindell et al. 2008, Zarza et al. 2011, Singhal y Craig 2012), confirman la necesidad de utilizar marcadores tanto mitocondriales como nucleares a la hora de reconstruir historias filogeográficas y demográficas complejas (Godinho et al. 2008, Zarza et al. 2011).

Por otra parte, la aparición sintópica de haplotipos E2 y E3 es la única situación de contacto secundario plausible que no se ha detectado en nuestros muestreos. Es posible que el clado E3, tras haberse diferenciado en algún refugio del interior, se haya expandido con la mejora del clima hasta establecer contacto por el norte y el oeste con poblaciones del linaje occidental (W1 y posiblemente W2). Por el este y el sudeste, sin embargo, su expansión (y la del clado E2 hacia el oeste) se habría visto frenada por una

discontinuidad de hábitat entre las mitades oriental y occidental de la Península (para ejemplos similares de diferenciación este-oeste con las masas de quercíneas preferidas por *P. algirus*, véanse, entre otros, Petit et al. 2002a y 2002b y Lumaret et al. 2002; para la especie congénérica *P. hispanicus*, véase Fitze et al. 2011).

¿Qué tipo de evidencias apoyan esta discontinuidad? En primer lugar, los resultados del Capítulo 6, que clasifica 377 individuos de 23 poblaciones en función de la presencia o ausencia de una línea oscura mediodorsal y encuentra que las poblaciones orientales (E1 y E2) son principalmente rayadas (porcentaje medio de lagartijas rayadas = 90.5%), mientras que las poblaciones centrales y occidentales (E3, W1 y W2) son básicamente no rayadas (porcentaje medio de lagartijas rayadas = 9.5%). Esta variación es consistente con la hipótesis de que los patrones de coloración han evolucionado como una adaptación para potenciar la cripsis como estrategia antidepredatoria, a juzgar por los resultados de dos experimentos en los que se midieron los tiempos empleados por depredadores simulados (humanos) para detectar lagartijas rayadas y no rayadas en diferentes ambientes. En el primer experimento, se comparó la detectabilidad de lagartijas rayadas y no rayadas en las localidades de dos poblaciones orientales (E2) y dos poblaciones occidentales (W2); en las poblaciones orientales, las lagartijas rayadas resultaron más crípticas que las no rayadas, mientras que en las localidades occidentales sucedió lo contrario. En el segundo experimento con lagartijas de tres localidades cercanas (con haplotipos de E2, E3 y W2), la detectabilidad en la localidad con haplotipos E3 fue mayor para las lagartijas rayadas (E2) que para las no rayadas (tanto nativas como occidentales).

Además, y a nivel interpoblacional, cuanto más intenso es el patrón rayado en los individuos que lo presentan, mayor es su frecuencia en la población, lo que concuerda con las predicciones de un modelo de variación genética continua con un umbral de expresión para la línea oscura mediodorsal. De esta forma, la hipótesis que proponemos es que la selección direccional tendente a optimizar la capacidad de cripsis en cada población, hace que la mayoría de las poblaciones tengan, o bien muchos individuos rayados con un patrón contrastado de líneas claras y oscuras (hábitats de “tipo oriental”), o bien pocos o ningún individuo rayado, en cuyo caso el patrón de rayas en los pocos ejemplares que lo presentan tiende a ser tenue y poco contrastado (hábitats de “tipo occidental”).

Puesto que tanto los marcadores nucleares (microsatélites) del Capítulo 5 como los patrones de coloración del Capítulo 6 coinciden en indicar la peculiar situación del clado E3, más próximo al linaje occidental que a los otros dos clados orientales, parece necesaria una reinterpretación de los resultados obtenidos en los Capítulos 3 y 4, cuyo diseño y ejecución tuvieron lugar antes de conocer estos resultados. Por lo que concierne al Capítulo 4, hubiera sido deseable incluir alguna población del clado E3; sin embargo, los resultados obtenidos en ese capítulo siguen siendo útiles para discernir qué tipo de factores, relacionados con la incubación de los huevos (Monasterio et al. 2011), pueden estar limitando la expansión del clado E2 hacia el oeste. Aunque una vez más se plantean problemas de escala, que en sentido estricto restringen la aplicación de las relaciones encontradas a las poblaciones de Navacerrada, El Pardo, Aranjuez y Torrejuncillo (y por tanto a la zona de contacto del centro de la Península), no deja de ser cierto que la menor tasa de supervivencia (58%) corresponde a los juveniles de la población oriental de llanura (Aranjuez) incubados a 24 °C, lo que sugiere una menor tolerancia a la incubación a bajas temperaturas que puede haber limitado la expansión del linaje oriental desde el valle del Tajo hacia el piedemonte del Sistema Central. En relación al Capítulo 3, ya se ha señalado que a igualdad de condiciones climáticas (Oufiero y Angilletta 2006, Niewiarowski y Angilletta 2008, Du et al. 2010b), los tiempos de incubación de las hembras del clado E3 se parecen más a los de las hembras occidentales que a los de las hembras del este peninsular, lo que mejora sustancialmente la capacidad predictiva del modelo propuesto en la Figura 3.3 (variación del tiempo de incubación en función del clima y el linaje mitocondrial o patrón de coloración dominante).

Finalmente, hay que insistir en que los patrones de coloración dorsal podrían estar señalando la posición de una barrera ecológica en el centro de la Península que separaría las poblaciones occidentales no rayadas, de los clados mitocondriales W2 y E3, de las poblaciones orientales rayadas correspondientes al clado E2. Esta hipótesis implica dos corolarios interesantes. En primer lugar, la diferencia entre los ambientes que maximizan la crisis para cada uno de los fenotipos crearía las condiciones requeridas para que la selección pueda reforzar el aislamiento promoviendo el emparejamiento selectivo (“especiación ecológica”: Barluenga et al. 2006, Rosenblum 2006, Reynolds y Fitzpatrick 2007, Robertson y Rosenblum 2009); la distribución bimodal de la frecuencia de fenotipos rayados y su correlación negativa con la

intensidad de la línea vertebral oscura apoyan la idea de que los fenotipos “híbridos” están relativamente mal adaptados. En segundo lugar, el patrón de coloración suministra de por sí una señal visual en la que basar el emparejamiento selectivo, sin excluir efectos pleiotrópicos (Reynolds y Fitzpatrick 2007, Robertson y Rosenblum 2009 y 2010) que podrían afectar al desarrollo de otros caracteres, como la coloración rojizo-anaranjada de la cabeza de los machos que se sabe juega un papel determinante en los procesos de selección sexual (Díaz 1993, Martín y Forsman 1999, Carretero 2002).

VIII. CONCLUSIONES

1.- Un análisis filogeográfico con poblaciones de *Psammodromus algirus* de la Península Ibérica y del Norte de África, incluyendo material tipo de *P. jeanneae* y *P. manuelae*, ha demostrado que estos taxones representan los clados sur y norte del linaje occidental, convirtiendo a *P. algirus* en parafilético, lo que unido a la escasa diferenciación dentro de dicho linaje, hace aconsejable considerar a *P. jeanneae* y *P. manuelae* como sinónimos de *P. algirus*.

2.- Dentro de los linajes oriental y occidental, la incubación es más corta en los sitios más fríos y húmedos, y para un clima dado, es más corta para las poblaciones orientales, sugiriendo procesos de variación contragradiante que habrían evolucionado de forma independiente en ambos linajes. El tamaño de la hembra y la fecundidad relativa varían entre poblaciones ajustándose a las diferencias ambientales en productividad, a la vez que las hembras de sitios más cálidos y secos producen juveniles más grandes.

3.- Los huevos incubados a 24 °C producen juveniles más largos y pesados y con colas más cortas que los incubados a 32 °C, pero como estos últimos crecen más rápido, a los 30 días han compensado su desventaja inicial. Puesto que la supervivencia es menor para los juveniles incubados a baja temperatura y del linaje oriental, especialmente los de la población a menor altitud, estas diferencias pueden estar limitando la expansión hacia el oeste del linaje oriental en el centro de la Península.

4.- Las poblaciones analizadas se agrupan en un linaje occidental con clados sur y norte (W1 y W2) y un linaje oriental con tres clados, el primero restringido al sureste (E1), el segundo ocupando casi toda la mitad oriental (E2) y el tercero en el centro de la Península (E3). Los clados W2, E2 y E3 tienen la estructura típica de poblaciones en expansión demográfica. Por otra parte, los análisis con microsatélites revelan elevados niveles de flujo entre poblaciones de los clados W2 y E3. La aparición sintópica de haplotipos E2 y E3 no se detectó en el muestreo. Este patrón podría explicarse considerando que el clado E3, tras haberse diferenciado en algún refugio pleistocénico del interior peninsular, se habría expandido hasta establecer contacto por el norte y el oeste con poblaciones occidentales, mientras que por el este y el sudeste su expansión se habría visto frenada por barreras ecológicas.

5.- Las poblaciones de los clados E1 y E2 tienen un patrón de coloración dorsal mayoritariamente rayado, mientras que las poblaciones de los clados W1, W2 y E3 son básicamente no rayadas. Ambos fenotipos incrementan la capacidad de crípsis de las lagartijas en sus respectivos hábitats, lo que sugiere que los patrones de coloración dorsal han evolucionado en respuesta a la selección natural inducida por la depredación, y que el patrón no rayado ha aparecido de forma convergente en ambos linajes.

SUMMARY: Origin and maintenance of phenotypic diversity in Iberian populations of the lizard *Psammodromus algirus***1. Introduction**

Understanding the evolutionary causes of phenotypic variation among populations (geographic and genetic isolation, divergent natural or sexual selection, and/or phenotypic plasticity) has long been a central theme in evolutionary biology. The study of intraspecific variation has recently been bolstered by the development of phylogeography (Avice 1989), which is the study of the historical processes that may be responsible for the contemporary geographic distributions of structured genetic signals within and among species, and allows inferring past events such as population expansions or bottlenecks, vicariance, migration, and ongoing or complete speciation. Moreover, the study of hybrid zones revealed by phylogeographic data has led to important advances in understanding the nature of reproductive isolation (Barton and Hewitt 1985, Harrison 1993). Most well-characterized hybrid zones involve lineages with obvious phenotypic differences and some degree of pre- or post-zygotic isolation. However, phylogeographic studies are revealing an increasing number of zones of secondary contact between lineages that are deeply genetically divergent yet morphologically cryptic, that is, only distinguished with the hindsight of genetic information (Hewitt 2001). In most cases, whether the lineages have diverged in subtle aspects of their morphology, physiology or behaviour and whether there exist any barriers to gene flow is not known; yet this information is important for predicting the evolutionary consequences of secondary contact: stable co-existence, replacement, admixture or differentiation (Barton and Hewitt 1989, Harrison 1993, Hewitt 2001).

On the other hand, it is common knowledge that comparative studies of phenotypes (or phenotypes and environmental variables) across a range of species or higher taxa have to deal with the statistical implications of the fact that species are part of a hierarchically structured phylogeny. As noted by Felsenstein (1985), although it would be great to have a “simple and robust method that obviated the need to have an accurate knowledge of the phylogeny (...), there is no method that solves the problem. Comparative biologists may understandably feel frustrated upon being told that they need to know the phylogenies of their groups in great detail, when this is not something they had much interest in knowing. Nevertheless, efforts to cope with the effects of the

phylogeny will have to be made. Phylogenies are fundamental to comparative biology; there is no doing it without taking them into account". Intraspecific studies of adaptation that compare several populations of the same species are affected exactly by the same statistical problem, because populations, just as species, are part of a hierarchically structured pattern of phylogeographic events, and thus cannot be regarded for statistical purposes as if drawn independently from the same distribution (Felsenstein 1985). However, very few of such studies explicitly take into account the phylogenetic / phylogeographic relationships among the populations being compared.

Lizards in general, and Southern European ones in particular, are good models for the study of phenotypic and genetic diversification, due to their low mobility and their association with dry and warm climates (Gómez and Lunt 2007); these characteristics have led pleistocenic glacial advances to limit their distribution to the southernmost reaches of the European continent, where fragmentation of populations in suitable habitats has led to geographic structuring (see, for Iberian lizards, Paulo et al. 2001, Carranza et al. 2006, Godinho et al. 2006a, 2006b, 2008, Paulo et al. 2008, Fitze et al. 2011, Miraldo et al. 2011, Nunes et al. 2011). Moreover, lizards have become model organisms for evolutionary studies due to the accumulated knowledge of long-term demographics, life history strategies (Shine 2005, Iraeta et al. 2006, 2013), and adaptive ecomorphology and ecophysiology (Bauwens et al. 1995, Díaz et al. 1996), which together provide an ideal framework for phylogeographic and speciation studies (Camargo et al. 2010).

In fact, several researchers have explored, with the aid of molecular markers, the relative roles of gene flow, random drift and natural selection in the evolution of population differentiation in lizards (Oufiero and Angilletta 2006, Nunes et al. 2011, Malhotra and Thorpe 2000, Glor and Laport 2012). However, perhaps the study system that best exemplifies the potential of molecular approaches to improve our understanding of the origin and maintenance of intraspecific phenotypic variation in lizards is the one chosen by Erica Rosenblum and coworkers (Rosenblum 2006, Rosenblum et al. 2010, Robertson and Rosenblum and 2010), formed by three species of lizard (the phrynosomatids *Holbrookia maculata* and *Sceloporus undulatus* and the teiid *Aspidoscelis inornata*) in White Sands, New Mexico – a large patch of white hydrous calcium sulfate dunes surrounded by dark desert scrub. Rosenblum and her colleagues have determined that the three species have different mutations of the *Mc1r*

pigment gene that cause normally brown skin to be pale. When mutated, *Mclr* causes less brown pigment to be produced, helping the lizards blend in with the white sand (Rosenblum 2006). However the mutations have different effects in two of the lizards (Rosenblum et al. 2010). In *S. undulatus*, the blanched color was passed on as a dominant trait, whereas in *A. inornata*, it was a recessive trait. The effect of each mutation on the function of the *Mclr* protein in cell cultures is also different: the defective protein of *S. undulatus* does not integrate well into the cell membrane, whereas the defective protein of *A. inornata* settles fine into the membrane but it does not pass signals along very well. The lightened skin also changes other skin-color patterns -in particular, the yellow, orange, blue, and green that lizards rely on for social cues, affecting courtship and territorial behavior (Robertson and Rosenblum and 2010). In a few thousand generations, white *S. undulatus* males were more aggressive toward other white males and more attentive to the white females. But the colour changes also had an unexpected effect: white *S. undulatus* males tended to court the desert dark males, most likely because their blue belly patches made them look like White Sands females. Thus, Rosenblum and coworkers have documented a link between natural and sexual selection, by means of which a single mutation can have important effects for both adaptation and the early stages of speciation.

Within this conceptual framework, I investigated the origin and maintenance of phenotypic diversity in Iberian populations of the lacertid lizard *Psammodromus algirus*, a widely distributed species which contains divergent eastern and western mtDNA clades within the Iberian Peninsula (Carranza et al. 2006). The distribution ranges of these lineages, which diverged as early as in the Pliocene, overlap along a narrow contact zone in central Spain, in which a few hybrid populations have been found. This suggests some degree of isolation between them. There is also some evidence of phenotypic differentiation among populations (e.g. in colour pattern or incubation times) which is broadly coincident with the distribution of the two lineages. My main objectives were: 1) to revisit the phylogeographic structure of *P. algirus* and to clarify the status of the recently described species *Psammodromus jeanneae* and *P. manuelae* (Busack et al. 2006) using an enlarged data set of mtDNA gene sequences that includes paratypes of *P. jeanneae* and topotypes of *P. manuelae*; 2) to explore the historical processes that may have caused such phylogeographic structure using a combination of mitochondrial and nuclear markers (microsatellites) to infer past events

(e.g. population expansions or vicariance in separate refugia), along with current levels of isolation or gene flow; 3) to characterize phenotypic diversity with an emphasis on life-history and coloration traits; 4) to study the current processes that may be reinforcing or counteracting differentiation in central Iberia along a gradient perpendicular to the contact zone; and 5) to test whether such differentiation is merely a secondary consequence of reduced gene flow or it is maintained by natural selection promoting divergent adaptations in different environments.

In the following sections, I summarize the main findings of my study.

2. Phylogeography of *Psammodromus algirus* (Lacertidae) revisited: systematic implications

Relationships among *P. algirus* populations from the Iberian Peninsula and North Africa, including recently described *P. jeanneae* and *P. manuelae*, were estimated from mitochondrial DNA gene sequences. This enlarged data set confirmed the presence of two divergent eastern and western mitochondrial DNA lineages on the Iberian Peninsula, the distributions for which are separated by a narrow zone of contact across the centre of the Peninsula. Paratypes of *P. jeanneae* and topotypes of *P. manuelae* represent southern and northern clades of the western lineage, respectively, making *P. algirus* paraphyletic. This, together with the low level of allozymic and mitochondrial DNA substructuring within western populations, is not sufficient to retain *P. jeanneae* and *P. manuelae* as valid species, and we relegate them to the status of junior synonyms of *P. algirus*.

3. Intraspecific variation of reproductive traits in a Mediterranean lizard: clutch, population, and lineage effects

Widely distributed terrestrial ectotherms from the southern European peninsulas show patterns of subdivision (related to isolation in temperate refugia) that allow us to test the relative importance of phylogeographic lineage, population of origin and familial effects as sources of variation for life-history traits. We collected gravid females from 15 geographically separated populations of the lacertid lizard *P. algirus*, a widely distributed species with well differentiated eastern and western lineages. We incubated eggs under two treatments of constant (28 °C) and fluctuating (28 ± 4 °C) temperature, and we examined clutch, population, and lineage effects on several traits of females, eggs, and hatchlings. Incubation time was mainly explained by differences

between lineages, but it was also influenced by population and female effects. Within each lineage, incubation was shorter at cooler and wetter sites, and for a given climate it was shorter for eastern than for western populations, suggesting that countergradient variation has evolved independently in the two lineages. Female size, clutch size, and relative fecundity were primarily influenced by inter-population differences, a pattern that seemed attributable to environmental differences in productivity, because mean female size was positively correlated with a gradient of increasing precipitation and decreasing temperature. Clutch size was mainly, but not entirely, dependent on female SVL, suggesting both a proximate effect of local conditions and intrinsic differences among populations. Females from drier and warmer sites produced larger hatchlings. Mean egg mass was mainly determined by familial effects. Eggs incubated at a constant temperature hatched earlier than did their siblings incubated at fluctuating temperatures, a fact that could be explained by considering that in Mediterranean environments developmental rate might increase at a lower speed above average incubation temperature than it does decrease below it.

4. Phenotypic responses to incubation conditions in ecologically distinct populations of the lizard *Psammodromus algirus*: a tale of two phylogeographic lineages

We experimentally studied the effects of genetic legacy (eastern vs. western phylogeographic lineage) and population of origin (lowland vs. highland) on the sensitivity of lizard embryos and juveniles to incubation temperature and moisture. For that purpose, we compared four populations of the lacertid *P. algirus*. Incubation time was longer at lower temperature, increased slightly at higher moisture, and was shorter for highland than for lowland females. Eggs incubated at 24 °C produced larger, heavier, and shorter-tailed hatchlings than those incubated at 32 °C. Western juveniles survived better during their first month of life than eastern ones, and juveniles incubated at 32 °C survived better than those incubated at 24 °C; survivorship was lowest for 24 °C hatchlings from the eastern, lowland population. Because juveniles incubated at 32 °C grew more rapidly, after one month they had compensated their initial size disadvantage. Juveniles incubated at 80% moisture were larger and/or heavier than those incubated at 10% moisture both at hatching and after one month. The number of sprints per running trial was lower for eastern than for western juveniles, which ran longer total distances than eastern ones. Our results show that although incubation

temperature was the main source of phenotypic variation, not all its effects were evident at hatching. We also found that western juveniles were more tolerant to incubation at low temperature than eastern ones. Because the eastern lineage occupies warmer and drier areas than the western one, we suggest that such differences may have limited its westward expansion.

5. Nuclear markers reveal extensive gene flow between mitochondrial DNA lineages of a widespread Iberian lizard

The use of different molecular markers is becoming custom practice in studies of molecular ecology. Whereas mtDNA data are useful to disentangle the history of genetic lineages and to reveal phylogeographic patterns, rapid-evolving nuclear markers such as microsatellites allow us to estimate current levels of gene flow among populations. In this study we use mitochondrial sequences and seven microsatellite loci to identify distinct levels of population substructure in *P. algirus*. The analysis of 318 mtDNA sequences from 36 Iberian populations yielded 60 different haplotypes separated in two main phylogeographic lineages: a western lineage with southwestern and northwestern clades (hereafter W1 and W2), and an eastern lineage with three clades named E1 (restricted to the southeast), E2 (widely distributed throughout eastern Iberia), and E3 (occupying the central region of the southern half of the Iberian Peninsula, which overlaps with the distribution of the western lineage but is allopatrid to E2). According to haplotype network topologies, mismatch distribution analyses, and R_2 estimates, northern clades (W2, E2, and especially E3) displayed the typical structure of expanding populations. However, data of seven microsatellite loci from a subset of nine populations revealed a very different pattern of relationships, with a group of central populations showing high levels of gene flow and including populations with W2 and E3 haplotypes together with the only population which had haplotypes from both lineages (W1 and E3). On the other hand, the syntopic occurrence of E2 and E3 haplotypes was the only geographically realistic mixture that was not detected in our sampling. The hypothesis we propose to explain this phylogeographic pattern is that the E3 clade differentiated during the Pleistocene in a central Iberian refugium isolated from the rest of the eastern lineage. Then, after the ice retreat, it expanded westwards to form a secondary contact zone with populations of western origin (W1 and W2). However, its geographic expansion towards the east and southeast has been likely curtailed by the lack of suitable “western-type” habitats similar to those where E3

populations would have evolved. This interpretation is supported by the distribution of an ecologically relevant trait such as dorsal coloration, apparently an antipredatory adaptation to promote crypsis (see below): the dorsal coloration pattern of E3 lizards is like that of western (unstriped) lizards, rather than like that of eastern (striped) ones. Our results show that complex patterns of population history and current phenotypic diversity are only revealed by the combined use of mitochondrial and nuclear markers, and suggest that ecological barriers may act either to promote phenotypic divergence between sister clades from the same phylogeographic lineage (as in the case of E2 and E3), or to facilitate secondary contact and phenotypic convergence between clades from different phylogeographic lineages that have adapted to similar environments (as in the case of W1-2 and E3).

6. Geographic distribution of dorsal stripes in Iberian populations of *Psammodromus algirus*: the role of crypsis and phylogeography

Natural selection and restricted gene flow are responsible for the origin and maintenance of biological diversity, but their relative importance may vary spatially and over time, giving rise to complex patterns of genetic and phenotypic variation. Our aim here is to highlight the interplay of ancient divergence and current adaptation in shaping phenotypic diversity within a explicit phylogeographic context. For that purpose, we examined dorsal coloration (striped vs. unstriped) and genetic relationships of 23 Iberian populations of *P. algirus*. To test the hypothesis that color patterns have evolved as an adaptation to improve crypsis, we compared the time taken by simulated (human) predators to detect striped and unstriped lizards in different environments. All lizards were classified in two groups according to mitochondrial DNA: 1) a western lineage with southwestern (W1) and northwestern (W2) clades; and 2) an eastern lineage with a southeastern clade (E1), a widespread oriental clade (E2), and a central clade (E3). Dorsal coloration varied markedly among clades: eastern populations (E1 and E2) were mainly striped (mean percentage of striped lizards = 90.5%), whereas central and western populations (E3, W1 and W2) were basically unstriped (mean percentage of striped lizards = 9.5%). Two experiments supported the hypothesis that this geographically consistent color pattern enhanced crypsis and was adaptive. In the first experiment, we compared the detectability of striped and unstriped lizards in the locations of two eastern (E2) and two western (W2) populations. In eastern locations, striped lizards were more cryptic than unstriped ones (i.e. their detection times were

longer), whereas the opposite was true in western locations. In the second experiment with lizards from three nearby sites (with E2, E3, and W2 haplotypes), detection times in the location of the E3 population were shorter for striped (E2) than for unstriped (either native or western) lizards. Thus, our results support the hypothesis that dorsal coloration has undergone convergent evolution in previously differentiated eastern and western clades in response to predator-induced natural selection. In addition, the analysis of 7 microsatellite loci in the same three populations separated E2 from E3+W2 lizards, defining two distinct groups that matched the phenotypic pattern. We conclude that natural selection can promote either convergence between highly differentiated lineages (as in the case of E3 and W1-W2) or divergence within them (as in the case of E3 and E1-E2), and that the effects of ancestral isolation may be blurred or even counteracted by current adaptation to the local environment.

7. Conclusions

1.- A phylogeographic analysis with *Psammodromus algirus* populations from the Iberian Peninsula and Northern Africa, including type material from the recently described *P. jeanneae* y *P. manuelae*, showed that these taxa represent the northern and southern clades, respectively, of the previously described *P. algirus* western lineage. This, together with the low level of allozymic and mitochondrial DNA substructuring within western populations, is not sufficient to retain *P. jeanneae* and *P. manuelae* as valid species, and I relegate them to the status of junior synonyms of *P. algirus*.

2.- Incubation of clutches from 15 populations of western and eastern lineages of *P. algirus* revealed that within each lineage, incubation was shorter at cooler and wetter sites, and for a given climate it was shorter for eastern than for western populations, suggesting that countergradient variation has evolved independently in the two lineages. In both lineages, between-populations variation in female size, clutch size, and relative fecundity reflected environmental differences in productivity, and females from drier and warmer sites produced larger juveniles.

3.- A experimental study of the effects of lineage and population of origin (lowland vs. highland) on the sensitivity of embryos and juveniles to incubation temperature and moisture showed that eggs incubated at 24 °C produced larger, heavier, and shorter-tailed hatchlings than those incubated at 32 °C. However, juveniles incubated at 32 °C

grew more rapidly, and after one month they had compensated their initial size disadvantage. Western juveniles survived better than eastern ones, and juveniles incubated at 32 °C survived better than those incubated at 24 °C; survivorship was lowest for 24 °C hatchlings from the eastern, lowland population. This suggests that these differences may have limited the westward expansion of eastern lizards at the centre of the Iberian Peninsula.

4.- The analysis of 318 mtDNA sequences from 36 Iberian populations produced 60 different haplotypes separated in two main phylogroups: a western lineage with south-western and northwestern clades (hereafter W1 and W2), and an eastern lineage with clades E1 (restricted to the southeast), E2 (widely distributed throughout eastern Iberia), and E3 (occupying the central region of southern Iberia). Northern clades (W2, E2, and E3) showed evidence of recent expansion, and data of seven microsatellite loci revealed a group of W1-W2 and E3 central populations that showed high levels of gene flow and included the only ‘hybrid’ population found (W1+E3). On the other hand, the syntopic occurrence of E2 and E3 haplotypes was the only feasible admixture that was not detected in our sampling. I hypothesize that the E3 clade differentiated during the Pleistocene in a central, isolated refuge from where it expanded westwards to form a secondary contact zone with W1 and W2 populations, whereas its expansion towards the E and SE was curtailed by ecological barriers.

5.- A biogeographical analysis of dorsal coloration (striped vs. unstriped) showed that eastern populations (E1 and E2) were mainly striped, whereas western and central populations (W1, W2 and E3) were mainly unstriped. Two experiments that measured the detectability of lizards for human observers suggested that this geographically consistent colour pattern enhanced crypsis: at locations inhabited by E2 lizards, the striped phenotype was more cryptic, whereas at locations inhabited by E3 and western lizards, the opposite was true. Thus, our results support the hypothesis that dorsal coloration has undergone convergent evolution in eastern and western lineages as an adaptive antipredatory response.

8. Literature Cited

- Avice JC (1989). Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution* **43**: 1192-1208.

- Bauwens D, Garland T, Castilla AM, Van Damme R (1995). Evolution of sprint speed in lacertid lizards: morphological, physiological, and behavioral covariation. *Evolution* **49**: 848-863.
- Barton NH, Hewitt GM (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113-148.
- Barton NH, Hewitt GM (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**: 497-503.
- Busack SD, Salvador A, Lawson R (2006). Two new species in the genus *Psammodromus* (Reptilia: Lacertidae) from the Iberian Peninsula. *Annals of Carnegie Museum* **75**: 1-10.
- Camargo A, Sinervo B, Sites JW (2010). Lizards as model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Molecular Ecology* **19**: 3250-3270.
- Carranza S, Harris DJ, Arnold EN, Batista V, González de la Vega JP (2006). Phylogeography of the lacertid lizard, *Psammodromus algirus*, in Iberia and across the Strait of Gibraltar. *Journal of Biogeography* **33**: 1279-1288.
- Díaz JA, Bauwens D, Asensio B (1996). A comparative study of the relation between heating rates and ambient temperatures in lacertid lizards. *Physiological Zoology* **69**: 1359-1383.
- Felsenstein J (1985). Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* **125**: 1-15.
- Fitze PS, González-Jimena V, San-José LM, San Mauro D, Aragón P, Suárez T, Zardoya R (2011). Integrative analyses of speciation and divergence in *Psammodromus hispanicus* (Squamata: Lacertidae). *BMC Evolutionary Biology* **11**: 347.
- Glor RE, Laport RG (2012). Are subspecies of *Anolis* lizards that differ in dewlap color and pattern also genetically distinct? A mitochondrial analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64**: 255-260.
- Godinho R, Domingues V, Crespo EG, Ferrand N (2006a). Extensive intraspecific polymorphism detected by SSCP at the nuclear *C-mos* gene in the endemic Iberian lizard *Lacerta schreiberi*. *Molecular Ecology* **15**:731-738.
- Godinho R, Mendonça B, Crespo EG, Ferrand N (2006b). Genealogy of the nuclear β -fibrinogen locus in a highly structured lizard species: comparison with mtDNA and evidence for intragenic recombination in the hybrid zone. *Heredity* **96**: 454-463.
- Godinho R, Crespo EG, 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. *Molecular Ecology* **17**: 4670-4683.
- Gómez A, Lunt DH (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. En: S Weiss, N Ferrand (Eds.). *Phylogeography of southern european refugia: evolutionary perspectives on the origins and conservation of european biodiversity*, pp. 155-188. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Harrison RG (1993). Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, Oxford.

- Hewitt GM (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**: 537-549.
- Iraeta P, Monasterio C, Salvador A, Díaz JA (2006). Mediterranean hatchling lizards grow faster at higher altitude: a reciprocal transplant experiment. *Functional Ecology* **20**: 865-872.
- Iraeta P, Salvador A, Díaz JA (2013). Life-history traits of two Mediterranean lizard populations: a possible example of countergradient covariation. *Oecologia* **172**: 167-176.
- Malhotra A, Thorpe RS (2000). The dynamics of natural selection and vicariance in the Dominican anole: patterns of within-island molecular and morphological divergence. *Evolution* **54**: 245-258.
- Miraldo A, Hewitt GM, Paulo OS, Emerson BC (2011). Phylogeography and demographic history of *Lacerta lepida* in the Iberian Peninsula: multiple refugia, range expansions and secondary contact zones. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 170.
- Nunes VL, Miraldo A, Beaumont MA, Butlin RK, Paulo OS (2011). Association of *Mc1r* variants with ecologically relevant phenotypes in the European ocellated lizard, *Lacerta lepida*. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 2289-2298.
- Oufiero CE, Angilletta MJ (2006). Convergent evolution of embryonic growth and development in the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*). *Evolution* **60**: 1066-1075.
- Paulo OS, Dias C, Bruford MW, Jordan WC, Nichols RA (2001). The persistence of Pliocene populations through the Pleistocene climatic cycles: evidence from the phylogeography of an Iberian lizard. *Proceeding of the Royal Society B* **268**: 1625-1630.
- Paulo OS, Pinheiro J, Miraldo A, Bruford MW, Jordan WC, Nichols RA (2008). The role of vicariance vs. dispersal in shaping genetic patterns in ocellated lizard species in the western Mediterranean. *Molecular Ecology* **17**: 1535-1551.
- Robertson JM, Rosenblum EB (2010). Male territoriality and 'sex confusion' in recently adapted lizards at White Sands. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 1928-1936.
- Rosenblum EB (2006). Convergent evolution and divergent selection: lizards at the White Sands ecotone. *The American Naturalist* **167**: 1-15.
- Rosenblum EB, Römler H, Schöneberg T, Hoekstra HE (2010). Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2113-2117.
- Shine R (2005). Life-history evolution in reptiles. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 23-46.

BIBLIOGRAFÍA

- Adolph SC, Porter WP (1993). Temperature, activity, and lizard life histories. *The American Naturalist* **142**: 273-295.
- Adolph SC, Porter WP (1996). Growth, seasonality, and lizard life histories: Age and size at maturity. *Oikos* **77**: 257-278.
- Alexandrino J, Arntzen JW, Ferrand N (2002). Nested clade analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Heredity* **88**: 66-74.
- Alexandrino J, Teixeira J, Arntzen JW, Ferrand N (2007). Historical biogeography and conservation of the golden-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*) in northwestern Iberia: integrating ecological, phenotypic and phylogeographic data. En: S Weiss, N Ferrand (Eds.). *Phylogeography of southern european refugia: evolutionary perspectives on the origins and conservation of european biodiversity*, pp. 189-205. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Alföldi J, Di Palma F, Grabherr M, Williams C, Kong L, Mauceli E, Russell P, Lowe CB, Glor RE, Jaffe JD, Ray DA, Boissinot S, Shedlock AM, Botka C, Castoe TA, Colbourne JK, Fujita MK, Moreno RG, ten Hallers BF, Haussler D, Heger A, Heiman D, Janes DE, Johnson J, de Jong PJ, Koriabine MY, Lara M, Novick PA, Organ CL, Peach SE, Poe S, Pollock DD, de Queiroz K, Sanger T, Searle S, Smith JD, Smith Z, Swofford R, Turner-Maier J, Wade J, Young S, Zadissa A, Edwards SV, Glenn TC, Schneider CJ, Losos JB, Lander ES, Breen M, Ponting CP, Kerstin Lindblad-Toh K (2011). The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* **477**: 587-591.
- Angilletta MJ, Winters RS, Dunham AE (2000). Thermal effects on the energetics of lizard embryos: implications for hatchling phenotypes. *Ecology* **81**: 2957-2968.
- Arévalo E, Davis SK, Sites JW (1994). Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Systematic Biology* **43**: 387-418.
- Arnold EN (1987). Resource partition among lacertid lizards in southern Europe. *Journal of Zoology London* **1**: 739-782.
- Arnold EN (1988). Caudal autotomy as a defense. En C Gans y RB Huey (Eds.). *Biology of the Reptilia, Vol. 16: Defense and Life History*, pp. 235-273. Alan R Liss, New York.

- Arnold EN, Burton JA (2007). Reptiles y anfibios: guía de campo. Ediciones Omega, Barcelona.
- Arnold EN, Arribas O, Carranza S (2007). Systematics of the Palaearctic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with descriptions of eight new genera. *Zootaxa* **1430**: 1-86.
- Arnold SJ (1983). Morphology, performance and fitness. *American Zoologist* **23**: 347-361.
- Avise JC (1989). Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution* **43**: 1192-1208.
- Avise JC (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.
- Avise JC, Neigel JE, Arnold J (1984). Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution* **2**: 9-105.
- Avise JC, Walker D, Johns GC (1998). Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society (B)* **265**: 1707-1712.
- Ballinger RE (1983). Life-history variations. En: RB Huey, ER Pianka, TW Schoener (Eds.). *Lizard ecology: studies of a model organism*, pp. 241-260. Harvard University Press, Cambridge.
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**: 155-165.
- Barluenga M, Stölting KN, Salzburger W, Muschick M, Meyer A (2006). Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. *Nature* **439**: 719-723.
- Barsh GS (1996). The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends in Genetics* **12**: 299-305.
- Barbadillo LJ, Lacomba JI, Pérez-Mellado V, Sancho V, López-Jurado LF (1999). Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. GeoPlaneta, Barcelona.
- Barton NH, Hewitt GM (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113-148.
- Barton NH, Hewitt GM (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**: 497-503.
- Bateman PW, Fleming PA (2009). To cut a long tail short: a review of lizard caudal autotomy studies carried out over the last 20 years. *Journal of Zoology* **277**: 1-14.
- Baum DA, Larson A (1991). Adaptation reviewed: a phylogenetic methodology for studying character macroevolution. *Systematic Zoology* **40**: 1-18.

- Bauwens D, Díaz-Uriarte R (1997). Covariation of life-history traits in lacertid lizards: A comparative study. *The American Naturalist* **149**: 91-111.
- Bauwens D, Thoen C (1981). Escape tactics and vulnerability to predation associated with reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Animal Ecology* **50**: 733-743.
- Bauwens D, Garland T, Castilla AM, Van Damme R (1995). Evolution of sprint speed in lacertid lizards: morphological, physiological, and behavioral covariation. *Evolution* **49**: 848-863.
- Beebee TJC, Rowe G (2000). Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. *Biological Journal of the Linnean Society* **69**: 367-381.
- Bellairs ADA, Bryant SV (1985). Autotomy and regeneration in reptiles. En BC Gans y F Billet (Eds.). *Biology of the Reptilia, Vol. 15: Development*, pp. 301-410. Wiley, New York.
- Bernardo J (1996). The particular maternal effect of propagule size, especially egg size: patterns, models, quality of evidence and interpretations. *American Zoologist* **36**: 216-236.
- Bloor P, Dávila JA (2008). Polymorphic microsatellite markers for the lizard *Psammodromus algirus* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Ecology Resources* **8**: 631-633.
- Blouin-Demers G, Weatherhead PJ, Row JR (2004). Phenotypic consequences of nest-site selection in black rat snakes (*Elaphe obsoleta*). *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie* **82**: 449-456.
- Booth DT, Thompson MB, Herring S (2000). How incubation temperature influences the physiology and growth of embryonic lizards. *Journal of Comparative Physiology B* **170**: 269-276.
- Booth DT (2004). Artificial incubation. En: DC Deeming (Ed.). *Reptilian Incubation: environment, evolution and behaviour*, pp. 253-263. Nottingham University Press, Nottingham.
- Brandt R, Navas CA (2011). Life-history evolution on tropidurinae lizards: influence of lineage, body size and climate. *PLOS ONE* **6**: e20040.
- Braña F, Ji X (2000). Influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance, and early growth of hatchling wall lizards (*Podarcis muralis*). *Journal of Experimental Zoology* **286**: 422-433.

- Brewer S, Cheddadi R, de Beaulieu JL, Reille M (2002). The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management* **156**: 27-48.
- Brown JH, Stevens GC, Kaufman DM (1996). The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 597-623.
- Buckley CR, Jackson M, Youssef M, Irschick DJ, Adolph SC (2007). Testing the persistence of phenotypic plasticity after incubation in the western fence lizard, *Sceloporus occidentalis*. *Evolutionary Ecology Research* **9**: 169-183.
- Buckley CR, Irschick DJ, Adolph SC (2010). The contributions of evolutionary divergence and phenotypic plasticity to geographic variation in the western fence lizard, *Sceloporus occidentalis*. *Biological Journal of the Linnean Society* **99**: 84-98.
- Busack SD, Lawson R (2006). Historical biogeography, mitochondrial DNA, and allozymes of *Psammodromus algirus* (Lacertidae): a preliminary hypothesis. *Amphibia-Reptilia* **27**: 181-193.
- Busack SD, Salvador A, Lawson R (2006). Two new species in the genus *Psammodromus* (Reptilia: Lacertidae) from the Iberian Peninsula. *Annals of Carnegie Museum* **75**: 1-10.
- Bull JJ (1980). Sex determination in reptiles. *Quarterly Review of Biology* **55**: 3-21.
- Caley MJ, Schwarzkopf L (2004). Complex growth rate evolution in a latitudinally widespread species. *Evolution* **58**: 862-869.
- Camargo A, Sinervo B, Sites JW (2010). Lizards as model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Molecular Ecology* **19**: 3250-3270.
- Carranza S, Harris DJ, Arnold EN, Batista V, González de la Vega JP (2006). Phylogeography of the lacertid lizard, *Psammodromus algirus*, in Iberia and across the Strait of Gibraltar. *Journal of Biogeography* **33**: 1279-1288.
- Carrascal LM, Díaz JA (1989). Thermal ecology and spatio-temporal distribution of the Mediterranean lizard *Psammodromus algirus*. *Holarctic Ecology* **12**: 137-143.
- Carrascal LM, Díaz JA, Huertas DL, Mozetich I (2001). Behavioral thermoregulation by treecreepers: trade-off between saving energy and reducing crypsis. *Ecology* **82**: 1642-1654.
- Carretero MA (2002). Sources of colour pattern variation in Mediterranean *Psammodromus algirus*. *Netherlands Journal of Zoology* **52**: 43-60.

- Carretero MA, Montori A, Llorente GA, Santos X (1997). *Psammodromus algirus* (Linnaeus, 1758). En: JM Pleguezuelos (Ed.). *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*. Universidad de Granada.
- Carretero MA, Ayllón E, Llorente G (2011). Lista patrón de los anfibios y reptiles de España (actualizada en julio de 2011). Asociación Herpetológica Española, Barcelona.
- Chamaillé-Jammes S, Massot M, Aragón P, Clobert J (2006). Global warming and positive fitness response in mountain populations of common lizards *Lacerta vivipara*. *Global Change Biology* **12**: 392-402.
- Charruau P, Fernandes C, Orozco-terWengel P, Peters J, Hunter L, Ziaie H, Jourabchian A, Jowkar H, Schaller G, Ostrowski S, Vercammen P, Grange T, Schlötterer C, Kotze A, Geigl E-M., Walzer C, Burger PA (2011). Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term isolates. *Molecular Ecology* **20**: 706-724.
- Cheverud JM, Dow MM, Leutenegger W (1985). The quantitative assessment of phylogenetic constraints in comparative analyses: sexual dimorphism in body weight among primates. *Evolution* **39**: 1335-1351.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1659.
- Cooper WE, Greenberg N (1992). Reptilian coloration and behavior. En: C Gans y D Crews (Eds.). *Biology of the Reptilia, Vol. 18: Physiology and Behavior*. University of Chicago Press, Chicago.
- Corl A, Davis AR, Kuchta SR, Comendant T, Sinervo B (2010). Alternative mating strategies and the evolution of sexual size dimorphism in the side-blotched lizard, *Uta stansburiana*: a population-level comparative analysis. *Evolution* **64**: 79-96.
- Cott HB (1940). Adaptive coloration in animals. Methuen, London.
- Coyne JA, Orr HA (2004). Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Crochet PA, Chaline O, Surget-Groba Y, Debain C, Cheylan M (2004). Speciation in mountains: phylogeography and phylogeny of the rock lizards genus *Iberolacerta* (Reptilia: Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**: 860-866.
- Crowley SR (1985). Thermal sensitivity of sprint-running in the lizard *Sceloporus undulatus*: support for a conservative view of thermal physiology. *Oecologia* **66**: 219-225.

- Cunningham CW (1997). Is congruence between data partitions a reliable predictor of phylogenetic accuracy? Empirically testing an iterative procedure for choosing among phylogenetic methods. *Systematic Biology* **46**: 464-478.
- Darwin CR (1859). On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, London.
- Deeming DC (2004). Reptilian Incubation: environment, evolution and behaviour. Nottingham University Press, Nottingham.
- Deeming DC, Ferguson MWJ (1991). Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. En: DC Deeming, MWJ Ferguson (Eds.). *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*, pp.147-171. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dial BE, Grismer LL (1992). A phylogenetic analysis of physiological-ecological character evolution in the lizard genus *Coleonyx* and its implications for historical biogeographic reconstruction. *Systematic Biology* **41**: 178-195.
- Díaz JA (1991). Temporal patterns of basking behaviour in a Mediterranean lacertid lizard. *Behaviour* **118**: 1-14.
- Díaz JA (1992). Choice of compass directions around shrub patches by the heliothermic lizard *Psammodromus algirus*. *Herpetologica* **48**: 293-300.
- Díaz JA (1993). Breeding coloration, mating opportunities, activity, and survival in the lacertid lizard *Psammodromus algirus*. *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie* **71**: 1104-1110.
- Díaz JA (1994). Effects of body temperature on the predatory behaviour of the lizard *Psammodromus algirus* hunting winged and wingless prey. *Herpetological Journal* **4**: 145-150.
- Díaz JA (1997). Ecological correlates of the thermal quality of an ectotherm's habitat: a comparison between two temperate lizard populations. *Functional Ecology* **11**: 79-89.
- Díaz JA, Cabezas-Díaz S (2004). Seasonal variation in the contribution of different behavioural mechanisms to lizard thermoregulation. *Functional Ecology* **18**: 867-875.
- Díaz JA, Carrascal LM (1990). Prey size and food selection of *Psammodromus algirus* (Lacertidae) in Central Spain. *Journal of Herpetology* **24**: 342-347.
- Díaz JA, Carrascal LM (1991). Regional distribution of a Mediterranean lizard: influence of habitat cues and prey abundance. *Journal of Biogeography* **18**: 291-297.

- Díaz JA, Carrascal LM (1993). Variation in the effect of profitability on prey size selection by the lacertid lizard *Psammodromus algirus*. *Oecologia* **94**: 23-29.
- Díaz JA, Bauwens D, Asensio B (1996). A comparative study of the relation between heating rates and ambient temperatures in lacertid lizards. *Physiological Zoology* **69**: 1359-1383.
- Díaz JA, Carbonell R, Virgos E, Santos T, Tellería JL (2000). Effects of forest fragmentation on the distribution of the lizard *Psammodromus algirus*. *Animal Conservation* **3**: 235-240.
- Díaz JA, Pérez-Tris J, Tellería JL, Carbonell R, Santos T (2005). Reproductive investment of a lacertid lizard in fragmented habitat. *Conservation Biology* **19**: 1578-1585.
- Díaz JA, Iraeta P, Monasterio C (2006). Seasonality provokes a shift of thermal preferences in a temperate lizard, but altitude does not. *Journal of Thermal Biology* **31**: 237-242.
- Díaz JA, Pérez-Tris J, Bauwens D, Pérez-Aranda D, Carbonell R, Santos T, Tellería JL (2007). Reproductive performance of a lacertid lizard at the core and the periphery of the species' range. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**: 87-96.
- Díaz JA, Iraeta P, Verdú-Ricoy J, Siliceo I, Salvador A (2012). Intraspecific variation of reproductive traits in a Mediterranean lizard: clutch, population, and lineage effects. *Evolutionary Biology* **39**: 106-115.
- Downes S, Shine R (2001). Why does tail loss increase a lizard's later vulnerability to snake predators? *Ecology* **82**: 1293-1303.
- Du WG, Shine R (2010). Why do the eggs of lizards (*Bassiana duperreyi*: Scincidae) hatch sooner if incubates at fluctuating rather than constant temperatures? *Biological Journal of the Linnean Society* **101**: 642-650.
- Du WG, Ji X (2006). Effects of constant and fluctuating temperatures on egg survival and hatchling traits in the northern grass lizard (*Takydromus septentrionalis*, Lacertidae). *Journal of Experimental Zoology A* **305**: 47-54.
- Du WG, Ji X, Zhang YP, Xu XF, Shine R (2005a). Identifying sources of variation in reproductive and life-history traits among five populations of a Chinese lizard (*Takydromus septentrionalis*, Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 443-453.
- Du WG, Lu YW, Shen JY (2005b). The influence of maternal thermal environments on reproductive traits and hatchling traits in a Lacertid lizard, *Takydromus septentrionalis*. *Journal of Thermal Biology* **30**: 153-161.

- Du WG, Warner DA, Langkilde T, Robbins T, Shine R (2010a). The physiological basis of geographic variation in rates of embryonic development within a widespread lizard species. *The American Naturalist* **176**: 522-528.
- Du WG, Ji X, Zhang YP, Lin ZH, Xu XF (2010b). Geographic variation in offspring size of a widespread lizard (*Takydromus septentrionalis*): importance of maternal investment. *Biological Journal of the Linnean Society* **101**: 59-67.
- Edmunds M (1974). Defence in animals. Longman Inc., New York.
- Elphick MJ, Shine R (1998). Longterm effects of incubation temperatures on the morphology and locomotor performance of hatchling lizards (*Bassiana duperreyi*, Scincidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **63**: 429-447.
- Endler JA (1978). A predator's view of animal color patterns. *Evolutionary Biology* **11**: 319-364.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**:47-50.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996). Introduction to quantitative genetics. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1994). Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**: 315-319.
- Felsenstein J (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Felsenstein J (1985a). Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* **125**: 1-15.
- Felsenstein J (1985b). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Ferguson GW, Fox SF (1984). Annual variation of survival advantage of large juvenile side-blotched lizards, *Uta stansburiana*: its causes and evolutionary significance. *Evolution* **38**: 342-349.
- Ferguson GW, Talent LG (1993). Life-history traits of the lizard *Sceloporus undulatus* from two populations raised in a common laboratory environment. *Oecologia* **93**: 88-94.

- Fitch HS (1970). Reproductive cycles of lizards and snakes. Miscellaneous Publication **52**: 1-247, University of Kansas Museum of Natural History, Kansas.
- Fitze PS, González-Jimena V, San-José LM, San Mauro D, Aragón P, Suárez T, Zardoya R (2011). Integrative analyses of speciation and divergence in *Psammodromus hispanicus* (Squamata: Lacertidae). *BMC Evolutionary Biology* **11**: 347.
- Fitze PS, González-Jimena V, San-José LM, San Mauro D, Zardoya R (2012). A new species of sand racer, *Psammodromus* (Squamata: Lacertidae), from the Western Iberian Peninsula. *Zootaxa* **3205**: 41-52.
- Forsman A, Shine R (1995a). Parallel geographic variation in body shape and reproductive life history within the Australian scincid lizard *Lampropholis delicata*. *Functional Ecology* **9**: 818-828.
- Forsman A, Shine R (1995b). The adaptive significance of colour pattern polymorphism in the Australian scincid lizard *Lampropholis delicata*. *Biological Journal of the Linnean Society* **55**: 273-291.
- Fu JZ (2000). Toward the phylogeny of the family Lacertidae - Why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biological Journal of the Linnean Society* **71**: 203-217.
- Gans C, Huey RB (1988). Biology of the Reptilia, Vol. 16: Defense and Life History. Alan R. Liss, New York.
- García-París M, Alcobendas M, Buckley D, Wake DB (2003). Dispersal of viviparity across contact zones in Iberian populations of fire salamanders (*Salamandra*) inferred from discordance of genetic and morphological traits. *Evolution* **57**: 129-143.
- Gaston KJ (2003). The structure and dynamics of geographic ranges. Oxford University Press, Oxford.
- Gaston KJ (2009). Geographic range limits: achieving synthesis. *Proceedings of the Royal Society (B)* **276**: 1395-1406.
- Gil Costa M (1992). Estudio de la comunidad de saurios de la vertiente meridional de la Sierra de Gredos. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Glor RE, Laport RG (2012). Are subspecies of *Anolis* lizards that differ in dewlap color and pattern also genetically distinct? A mitochondrial analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64**: 255-260.

- Godinho R, Domingues V, Crespo EG, Ferrand N (2006a). Extensive intraspecific polymorphism detected by SSCP at the nuclear *C-mos* gene in the endemic Iberian lizard *Lacerta schreiberi*. *Molecular Ecology* **15**:731-738.
- Godinho R, Mendonça B, Crespo EG, Ferrand N (2006b). Genealogy of the nuclear β -fibrinogen locus in a highly structured lizard species: comparison with mtDNA and evidence for intragenic recombination in the hybrid zone. *Heredity* **96**: 454-463.
- Godinho R, Crespo EG, 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. *Molecular Ecology* **17**: 4670-4683.
- Gómez A, Lunt DH (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. En: S Weiss, N Ferrand (Eds.). *Phylogeography of southern european refugia: evolutionary perspectives on the origins and conservation of european biodiversity*, pp. 155-188. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Grant BW, Dunham AE (1990). Elevational covariation in environmental constraints and life histories of the desert lizard *Sceloporus merriami*. *Ecology* **71**: 1765-1776.
- Greene HW (1988). Antipredator mechanisms in reptiles. En: C Gans y RB Huey (Eds.). *Biology of the Reptilia, Vol. 16: Defense and Life History*, pp. 1-152. Alan R. Liss, New York.
- Griswold CK, Baker AJ (2002). Time to the most recent common ancestor and divergence times of populations of common chaffinches (*Fringilla coelebs*) in Europe and North Africa: insights into Pleistocene refugia and current levels of migration. *Evolution* **56**: 143-153.
- Grivet D, Petit RJ (2002). Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology* **11**: 1351-1362.
- Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704.
- Hall T (2005). Bioedit. Carlsbad, CA, Ibis Therapeutics.
- Hamilton WD, Zuk M (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* **218**: 384-387.
- Hardy OJ, Charbonnel N, FrévilleH, Heuertz M (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* **163**: 1467-1482.
- Harris DJ, Carranza S, Arnold EN, Pinho C, Ferrand N (2002). Complex biogeographical distribution of genetic variation within *Podarcis* wall lizards across the Strait of Gibraltar. *Journal of Biogeography* **29**: 1257-1262.

- Harris DJ, Batista V, Carretero MA (2004). Assessment of genetic diversity within *Acanthodactylus erythrurus* (Reptilia: Lacertidae) in Morocco and the Iberian Peninsula using mitochondrial DNA sequence data. *Amphibia-Reptilia* **25**: 227-232.
- Harrison RG (1993). Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, Oxford.
- Harvey PH, Greenwood PJ (1978). Anti-predator defense strategies: some evolutionary problems. En: JR Krebs y NB Davies (Eds.). *Behavioral ecology: an evolutionary approach*, pp. 129-151. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Harvey PH, Mace GM (1982). Comparisons between taxa and adaptive trends: problems of methodology. En: King's College (University of Cambridge) (Eds.). *Current problems in sociobiology*, pp. 343-362. Cambridge University Press, Cambridge.
- Harvey PH, Pagel MD (1991). The comparative method in evolutionary biology. Oxford University Press, Oxford.
- Heatwole H (1968). Relationship of escape behavior and camouflage in Anoline lizards. *Copeia* **1968**: 109-113.
- Hertz PE, Huey RB, Nevo E (1983). Homage to Santa Anita: thermal sensitivity of sprint speed in agamid lizards. *Evolution* **37**: 1075-1084.
- Heulin B, Surget-Groba Y, Sinervo B, Miles D, Guiller A (2011). Dynamics of haplogroup frequencies and survival rates in a contact zone of two mtDNA lineages of the lizard *Lacerta vivipara*. *Ecography* **34**: 436-447.
- Hewitt GM (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.
- Hewitt GM (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.
- Hewitt G (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-913.
- Hewitt GM (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**: 537-549.
- Hey J (2010). Isolation with migration models for more than two populations. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 905-920.
- Hey J, Nielsen R (2007). Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 2785-2790.

- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1322-1332.
- Huelsenbeck JP, Ronquist FR (2001). MrBayes: Bayesian inference of the phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- Ibrahim KM, Cooper SJB, Hewitt GM (2002). Testing for recombination in a short nuclear DNA sequence of the European meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* **11**: 583-590.
- Iraeta P, Monasterio C, Salvador A, Díaz JA (2006). Mediterranean hatchling lizards grow faster at higher altitude: a reciprocal transplant experiment. *Functional Ecology* **20**: 865-872.
- Iraeta P, Díaz JA, Bauwens D (2007). Nest-site selection by *Psammodromus algirus* in a laboratory thermal gradient. *Journal of Herpetology* **41**: 360-364.
- Iraeta P, Salvador A, Díaz JA (2008). A reciprocal transplant study of activity, body size, and winter survivorship in juvenile lizards from two sites at different altitude. *Ecoscience* **15**: 298-304.
- Iraeta P, Salvador A, Monasterio C, Díaz JA (2010). Effects of gravidity on the locomotor performance and escape behaviour of two lizard populations: the importance of habitat structure. *Behaviour* **147**: 133-150.
- Iraeta P, Monasterio C, Salvador A, Díaz JA (2011). Sexual dimorphism and interpopulation differences in lizard hind limb length: locomotor performance or chemical signalling? *Biological Journal of the Linnean Society* **104**: 318-329.
- Iraeta P, Salvador A, Díaz JA (2012). Effects of caudal autotomy on postnatal growth rates of hatchling *Psammodromus algirus*. *Journal of Herpetology* **46**: 342-345.
- Iraeta P, Salvador A, Díaz JA (2013). Life-history traits of two Mediterranean lizard populations: a possible example of countergradient covariation. *Oecologia* **172**: 167-176.
- Irschick DJ, Garland T (2001). Integrating function and ecology in studies of adaptation: investigations of locomotor capacity as a model system. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**: 367-396.
- Irschick DJ, Carlisle E, Elstrott J, Ramos M, Buckley CR, Vanhooydonck B, Meyers JJ, Herrel A (2005). A comparison of habitat use, morphology, clinging performance and escape

- behaviour among two divergent green anole lizard (*Anolis carolinensis*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 223-234.
- Janzen FJ, Paukstis GL (1991). A preliminary test of the adaptive significance of environmental sex determination in reptiles. *Evolution* **45**: 435-440.
- Janzen FJ, Krenz JG, Haselkorn TS, Brodie Jr ED, Brodie III ED (2002). Molecular phylogeography of common garter snakes (*Thamnophis sirtalis*) in western North America: implications for regional historical forces. *Molecular Ecology* **11**: 1739-1751.
- Jaarola M, Searle JB (2002). Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **11**: 2613-2621.
- Ji X, Braña F (1999). The influence of thermal and hydric environments on embryonic use of energy and nutrients, and hatchling traits, in the wall lizards (*Podarcis muralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* **124**: 205-213.
- Ji X, Du WG (2001). Effects of thermal and hydric environments on incubating eggs and hatchling traits in the cobra, *Naja naja atra*. *Journal of Herpetology* **35**: 186-194.
- Johnston TA, Leggett WC (2002). Maternal and environmental gradients in the egg size of an iteroparous fish. *Ecology* **83**: 1777-1791.
- Kaliontzopoulou A, Pinho C, Harris DJ, Carretero MA (2011). When cryptic diversity blurs the picture: a cautionary tale from Iberian and North African *Podarcis* wall lizards. *Biological Journal of the Linnean Society* **103**: 779-800.
- Keogh JS, Scott IAW, Hayes C (2005). Rapid and repeated origin of insular gigantism and dwarfism in Australian tiger snakes. *Evolution* **59**: 226-233.
- Kettlewell HBD (1955). Selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. *Heredity* **9**: 323-342.
- Kettlewell HBD (1956). Further selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. *Heredity* **10**: 287-301.
- Kettlewell HBD (1958). A survey of the frequencies of *Biston betularia* (L.) (Lep.) and its melanic forms in Great Britain. *Heredity* **12**: 51-72.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 6196-6200.
- Kolbe JJ, Janzen FJ (2002). Impact of nest-site selection on nest success and nest temperature in natural and disturbed habitats. *Ecology* **83**: 269-281.

- Lack D (1954). The natural regulation of animal numbers. Oxford University Press, Oxford.
- Lenk P, Fritz U, Joger U, Wink M (1999). Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). *Molecular Ecology* **8**: 1911-1922.
- Lessa EP, Cook JA, Patton JL (2003). Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10331-10334.
- Levin SA (1992). The problem of pattern and scale in ecology: the Robert H. MacArthur Award Lecture. *Ecology* **73**: 1943-1967.
- Levins R (1968). Evolution in changing environments. Princeton University Press, Princeton.
- Levins R (1969). Thermal acclimation and heat resistance in *Drosophila* species. *The American Naturalist* **103**: 483-499.
- Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Lima, SL (1998). Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. *Advances in the Study of Behavior* **27**: 215-290.
- Lima SL, Dill LM (1990). Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie* **68**: 619-640.
- Lindell J, Méndez-De La Cruz FR, Murphy RW (2008). Deep biogeographical history and cytonuclear discordance in the black-tailed brush lizard (*Urosaurus nigricaudus*) of Baja California. *Biological Journal of the Linnean Society* **94**: 89-104.
- Logan DW, Burn SF, Jackson IJ (2006). Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. *Pigment Cell Research* **19**: 206-213.
- López de Heredia U, Carrión JS, Jiménez P, Collada C, Gil L (2007). Molecular and palaeoecological evidence for multiple glacial refugia for evergreen oaks on the Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography* **34**: 1505-1517.
- López P, Martín J, Cuadrado M (2003). Chemosensory cues allow male lizards *Psammodromus algirus* to override visual concealment of sexual identity by satellite males. *Behavioural Ecology and Sociobiology* **54**: 218-224.
- Lorenzon P, Clobert J, Massot M (2001). The contribution of phenotypic plasticity to adaptation in *Lacerta vivipara*. *Evolution* **55**: 392-404.

- Losos JB (2009) Lizards in an evolutionary tree: ecology and adaptive radiation of Anoles. University of California Press, Berkeley.
- Losos JB, Creer DA, Schulte JA (2002). Cautionary comments on the measurement of maximum locomotor capabilities. *Journal of Zoology* **258**: 57-61.
- Lugon-Moulin N, Brünner H, Wyttenbach A, Hausser J, Goudet J (1999). Hierarchical analyses of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora : Soricidae). *Molecular Ecology* **8**: 419-431.
- Lumaret R, Mir C, Michaud H, Raynal V (2002). Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Molecular Ecology* **11**: 2327-2336.
- Majerus, MEN (1998). Melanism: evolution in action. Oxford University Press, Oxford.
- Malhotra A, Thorpe RS (2000). The dynamics of natural selection and vicariance in the Dominican anole: patterns of within-island molecular and morphological divergence. *Evolution* **54**: 245-258.
- Manceau M, Domingues VS, Linnen CR, Rosenblum EB, Hoekstra HS (2010). Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **365**: 2439-2450.
- Martín J (2002). Evolución de estrategias antidepredatorias en reptiles. En: M Soler (Ed.), Evolución: la base de la biología, pp. 471-478. Ediciones Proyecto Sur, Granada.
- Martín J, Avery RA (1998). Effects of tail loss on the movement patterns of the lizard, *Psammodromus algirus*. *Functional Ecology* **12**: 794-802.
- Martín J, Forsman A (1999). Social costs and development of nuptial coloration in male *Psammodromus algirus* lizards: an experiment. *Behavioural Ecology* **10**: 396-400.
- Martín J, López P (1990). Amphibians and reptiles as prey of birds in southwestern Europe. *Smithsonian Herpetological Information Service* **82**: 1-43.
- Martín J, López P (1995). Influence of habitat structure on the escape tactics of the lizard *Psammodromus algirus*. *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie* **73**: 129-132.
- Martín J, López P (1996). The escape response of juvenile *Psammodromus algirus* lizards. *Journal of Comparative Psychology* **110**: 187-192.
- Martín J, López P (1999). Nuptial coloration and mate guarding affect escape decisions of male lizards *Psammodromus algirus*. *Ethology* **105**: 439-447.

- Martín J, López P (2001). Hindlimb asymmetry reduces escape performance in the lizard *Psammodromus algirus*. *Physiological and Biochemical Zoology* **74**: 619-624.
- Martín J, Civantos E, Amo L, López P (2007). Chemical ornaments of male lizards *Psammodromus algirus* may reveal their parasite load and health state to females. *Behavioural Ecology and Sociobiology* **62**: 173-179.
- Martínez-Solano I, Gonçalves HA, Arntzen JW, García-París M (2004). Phylogenetic relationships and biogeography of midwife toads (Discoglossidae: *Alytes*). *Journal of Biogeography* **31**: 603-618.
- Martínez-Solano I (2004). Phylogeography of Iberian *Discoglossus* (Anura: Discoglossidae). *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research* **42**: 298-305.
- Mason-Gamer RJ, Kellogg EA (1996). Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramineae). *Systematic Biology* **45**: 524-545.
- Mayer W, Pavlicev M (2007). The phylogeny of the family Lacertidae (Reptilia) based on nuclear DNA sequences: convergent adaptations to arid habitats within the subfamily Eremiainae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 1155-1163.
- Mayr E, Ashlock PD (1991). Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, New York.
- Mellado J, Martínez F (1974). Dimorfismo sexual en *Psammodromus algirus* (Reptilia, Lacertidae). *Doñana, Acta Vertebrata* **1**: 33-41.
- Merilaita S (1998). Crypsis through disruptive coloration in an isopod. *Proceedings of the Royal Society (B)* **265**: 1059-1064.
- Merilaita S (2003). Visual background complexity facilitates the evolution of camouflage. *Evolution* **57**: 1248-1254.
- Metcalfe NB, Monaghan P (2001). Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 254-260.
- Michaux JR, Libois R, Ramalhinho MG, Maurois C (1998). On the mtDNA restriction patterns variation of the Iberian wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). Comparison with other west Mediterranean populations. *Hereditas* **129**: 187-194.
- Michaux JR, Magnanou E, Paradis E, Nieberding C, Libois R (2003). Mitochondrial phylogeography of the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Molecular Ecology* **12**: 685-697.
- Mickevich MF, Farris JS (1981). The implications of congruence in Menidia. *Systematic Zoology* **30**: 351-370.

- Milá B, Girman D, Kimura M, Smith T (2000). Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North American songbird. *Proceedings of the Royal Society (B)* **267**: 1033-1040.
- Miles DB, Dunham AE (1992). Comparative analyses of phylogenetic effects in the life-history patterns of iguanid reptiles. *The American Naturalist* **139**: 848-869.
- Miraldo A, Hewitt GM, Paulo OS, Emerson BC (2011). Phylogeography and demographic history of *Lacerta lepida* in the Iberian Peninsula: multiple refugia, range expansions and secondary contact zones. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 170.
- Monasterio C, Shoo LP, Salvador A, Siliceo I, Díaz JA (2011). Thermal constraints on embryonic development as a proximate cause for elevational range limits in two Mediterranean lacertid lizards. *Ecography* **34**: 1030-1039.
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011). How many species are there on Earth and in the Ocean? *PloS Biology* **9**: e1000-1127.
- Moran MD (2003). Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *Oikos* **100**: 403-405.
- Niewiarowski PH, Angilletta MJ (2008). Countergradient variation in embryonic growth and development: do embryonic and juvenile performances trade off? *Functional Ecology* **22**: 895-901.
- Niewiarowski PH, Angilletta MJ, Leaché AD (2004). Phylogenetic comparative analysis of life-history variation among populations of the lizard *Sceloporus undulatus*: an example and prognosis. *Evolution* **58**: 619-633.
- Niewiarowski PH, Roosenburg W (1993). Reciprocal transplant reveals sources of variation in growth-rates of the lizard *Sceloporus undulatus*. *Ecology* **74**: 1992-2002.
- Ninyerola M, Pons X, Roure JM (2005). Atlas Climático Digital de la Península Ibérica. Metodología y aplicaciones en bioclimatología y geobotánica. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra.
- Norris KS, Lowe CH (1964). An analysis of background color-matching in amphibians and reptiles. *Ecology* **45**: 565-580.
- Nunes VL, Miraldo A, Beaumont MA, Butlin RK, Paulo OS (2011). Association of *Mc1r* variants with ecologically relevant phenotypes in the European ocellated lizard, *Lacerta lepida*. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 2289-2298.
- Olalde M, Herrán A, Espinel S, Goicoechea PG (2002). White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management* **156**: 89-102.

- Oufiero CE, Angilletta MJ (2006). Convergent evolution of embryonic growth and development in the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*). *Evolution* **60**: 1066-1075.
- Oufiero CE, Angilletta MJ (2010). Energetics of lizard embryos at fluctuating temperatures. *Physiological and Biochemical Zoology* **83**: 869-876.
- Packard GC (1991). The physiological and ecological importance of water to embryos of oviparous reptiles. En: DC Deeming, MWJ Ferguson (Eds.). *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*, pp. 213-228. Cambridge University Press, Cambridge.
- Palumbi SR (1996). Nucleic acids. II: the polymerase chain reaction. En: DM Hillis, C Moritz, BK Mable (Eds.). *Molecular Systematics*, pp. 205-247. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Parker SL, Andrews RM (2007). Incubation temperature and phenotypic traits of *Sceloporus undulatus*: implications for the northern limits of distribution. *Oecologia* **151**: 218-231.
- Paulo OS, Dias C, Bruford MW, Jordan WC, Nichols RA (2001). The persistence of Pliocene populations through the Pleistocene climatic cycles: evidence from the phylogeography of an Iberian lizard. *Proceeding of the Royal Society B* **268**: 1625-1630.
- Paulo OS, Pinheiro J, Miraldo A, Bruford MW, Jordan WC, Nichols RA (2008). The role of vicariance vs. dispersal in shaping genetic patterns in ocellated lizard species in the western Mediterranean. *Molecular Ecology* **17**: 1535-1551.
- Pérez-Tris J, Díaz JA, Tellería JL (2004). Loss of body mass under predation risk: cost of antipredatory behaviour or adaptive fit-for-escape? *Animal Behaviour* **67**: 511-521.
- Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, Burg K, Coart E, Cottrell J, van Dam B, Deans JD, Dumolin-Lapègue S, Fineschi S, Finkeldey R, Gillies A, Glaz I, Goicoechea PG, Jensen JS, König AO, Lowe AJ, Madsen SF, Mátyás G, Munro RC, Olalde M, Pemonge M-H, Popescu F, Slade D, Tabbener H, Turchini D, de Vries SGM, Ziegenhagen B, Kremer A (2002a). Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* **156**: 5-26.
- Petit RJ, Brewer S, Bordács S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, Cottrell J, Csaikl UM, van Dam B, Deans JD, Espinel S, Fineschi S, Finkeldey R, Glaz I, Goicoechea PG, Jensen JS, König AO, Lowe AJ, Madsen SF, Mátyás G, Munro RC, Popescu F, Slade D, Tabbener H, de Vries SGM, Ziegenhagen B, de Beaulieu J-L, Kremer A (2002b). Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on

- chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* **156**: 49-74.
- Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology* **209**: 2362-2367.
- Pina Martins, FR (2007). Phylogeography of the species *Psammodromus algirus*. Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento. Universidade de Lisboa, Facultad de Ciências, Departamento de Biologia Animal.
- Pincheira-Donoso D, Tregenza T (2011). Fecundity selection and the evolution of reproductive output and sex-specific body size in the *Liolaemus* lizard adaptive radiation. *Evolutionary Biology* **38**: 197-207.
- Pinho C, Ferrand N, Harris DJ (2006). Reexamination of the Iberian and North African *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) phylogeny based on increased mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 266-273.
- Pinho C, Harris DJ, Ferrand N (2007a). Contrasting patterns of population subdivision and historical demography in three western Mediterranean lizard species inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* **16**: 1191-1205.
- Pinho C, Harris DJ, Ferrand N (2007b). Comparing patterns of nuclear and mitochondrial divergence in a cryptic species complex: the case of Iberian and North African wall lizards (*Podarcis*, Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 121-133.
- Pinho C, Harris DJ, Ferrand N (2008). Non-equilibrium estimates of gene flow inferred from nuclear genealogies suggest that Iberian and North African wall lizards (*Podarcis* spp.) are an assemblage of incipient species. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 63.
- Pleguezuelos JM, Galán P, Fernández-Cardenete JR (2004). Communal nesting of *Psammodromus algirus* (Linnaeus, 1758), under extreme environmental conditions. *Amphibia-Reptilia* **25**: 333-336.
- Posada D (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253-1256.
- Pough FH (1980). The advantages of ectothermy for tetrapods. *The American Naturalist* **115**: 92-112.
- Pough FH (1988). Mimicry and related phenomena. En: C Gans y RB Huey (Eds.). *Biology of the Reptilia, Vol. 16: Defense and Life History*, pp. 153-234. Alan R. Liss, New York.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.

- Qualls CP, Andrews RM (1999). Cold climates and the evolution of viviparity in reptiles: cold incubation temperatures produce poor-quality offspring in the lizard *Sceloporus virgatus*. *Biological Journal of the Linnean Society* **67**: 353-376.
- Qualls FJ, Shine R (1998). Geographic variation in lizard phenotypes: importance of the incubation environment. *Biological Journal of the Linnean Society* **64**: 477-491.
- Qualls FJ, Shine R (2000). Post-hatching environment contributes greatly to phenotypic variation between two populations of the Australian garden skink, *Lampropholis guichenoti*. *Biological Journal of the Linnean Society* **71**: 315-341.
- Radder RS (2006). An overview of geographic variation in the life history traits of the tropical agamid lizard, *Calotes versicolor*. *Current Science* **91**: 1354-1363.
- Radder RS, Warner DA, Shine R (2007). Compensating for a bad start: catch-up growth in juvenile lizards (*Amphibolurus muricatus*, Agamidae). *Journal of Experimental Zoology A* **307**: 500-508.
- Rato C, Carranza S, Perera A, Carretero MA, Harris DJ (2010). Conflicting patterns of nucleotide diversity between mtDNA and nDNA in the Moorish gecko, *Tarentola mauritanica*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**: 962-971.
- Reedy AM, Zaragoza D, Warner DA (2013). Maternally chosen nest sites positively affect multiple components of offspring fitness in a lizard. *Behavioral Ecology* **24**: 39-46.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 2092-2100.
- Regal PJ (1983). The adaptive zone and behaviour of lizards. En: RB Huey, ER Pianka, TW Schoener (Eds.). *Lizard ecology: studies of a model organism*, pp. 105-118. Harvard University Press, Cambridge.
- Renoult JP, Geniez P, Bacquet P, Benoit L, Crochet, PA (2009). Morphology and nuclear markers reveal extensive mitochondrial introgressions in the Iberian Wall Lizard species complex. *Molecular Ecology* **18**: 4298-4315.
- Reynolds RG, Fitzpatrick BM (2007). Assortative mating in poison-dart frogs based on an ecologically important trait. *Evolution* **61**: 2253-2259.
- Richmond JQ, Reeder TW (2002). Evidence for parallel ecological speciation in scincid lizards of the *Eumeces skiltonianus* species group (Squamata: Scincidae). *Evolution* **56**: 1498-1513.

- Robertson JM, Rosenblum EB (2009). Rapid divergence of social signal coloration across the White Sands ecotone for three lizard species under strong natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society* **98**: 243-255.
- Robertson JM, Rosenblum EB (2010). Male territoriality and ‘sex confusion’ in recently adapted lizards at White Sands. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 1928-1936.
- Rodríguez-Díaz T, González F, Ji X, Braña F (2010). Effects of incubation temperature on hatchling phenotypes in an oviparous lizard with prolonged egg retention: are the two main hypotheses on the evolution of viviparity compatible? *Zoology* **113**: 33-38.
- Roff DA (1992). The evolution of life histories: theory and analysis. Chapman & Hall, New York.
- Rogers AR (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* **49**: 608-615.
- Rogers AR, Harpending H (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 552-569.
- Rohr DH (1997). Demographic and life-history variation in two proximate populations of a viviparous skink separated by a steep altitudinal gradient. *Journal of Animal Ecology* **66**: 567-578.
- Ronquist FR, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Rose B (1981). Factors affecting activity in *Sceloporus virgatus*. *Ecology* **62**: 706-716.
- Rosenblum EB (2005). The role of phenotypic plasticity in color variation of Tularosa Basin lizards. *Copeia* 586-596.
- Rosenblum EB (2006). Convergent evolution and divergent selection: lizards at the White Sands ecotone. *The American Naturalist* **167**: 1-15.
- Rosenblum EB (2008). Preference for local mates in a recently diverged population of the Lesser Earless Lizard (*Holbrookia maculata*) at White Sands. *Journal of Herpetology* **42**: 572-583.
- Rosenblum EB, Harmon LJ (2011). “Same same but different”: replicated ecological speciation at White Sands. *Evolution* **65**: 946-960.
- Rosenblum EB, Hoekstra HE, Nachman MW (2004). Adaptive reptile color variation and the evolution of the Mc1r gene. *Evolution* **58**: 1794-1808.

- Rosenblum EB, Römler H, Schöneberg T, Hoekstra HE (2010). Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2113-2117.
- Ruxton G, Colegrave N (2010). Experimental design for the life sciences. Oxford University Press, Oxford.
- Sætre G-P, Moum T, Bureš S, Král M, Adamjan M, Moreno J (1997). A sexually selected character displacement in flycatchers reinforces premating isolation. *Nature* **387**: 589-592.
- Salvador A (2002). Lagartija colilarga - *Psammmodromus algirus*. En: LM Carrascal, A Salvador (Eds.). *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Salvador A, Veiga JP (2001). Male traits and pairing success in the lizard *Psammmodromus algirus*. *Herpetologica* **57**: 77-86.
- Salvador A, Martín J, López P (1995). Tail loss reduces home range size and access to females in male lizards, *Psammmodromus algirus*. *Behavioural Ecology* **6**: 382-387.
- Salvador A, Veiga JP, Martín J, López P, Abelenda M, Puerta M (1996). The cost of producing a sexual signal: Testosterone increases the susceptibility of male lizards to ectoparasitic infestation. *Behavioural Ecology* **7**: 145-150.
- Salvador A, Veiga JP, Martín J, López P (1997). Testosterone supplementation in subordinate, small male lizards: consequences for aggressiveness, color development, and parasite load. *Behavioural Ecology* **8**: 135-139.
- Santos T, Díaz JA, Pérez-Tris J, Carbonell R, Tellería JL (2008). Habitat quality predicts the distribution of a lizard in fragmented woodlands better than habitat fragmentation. *Animal Conservation* **11**: 46-56.
- Santos T, Pérez-Tris J, Carbonell R, Tellería JL, Díaz JA (2009). Monitoring the performance of wild-born and introduced lizards in a fragmented landscape: Implications for ex situ conservation programmes. *Biological Conservation* **142**: 2923-2930.
- Schwarzkopf L, Shine R (1992). Costs of reproduction in lizards: escape tactics and susceptibility to predation. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **31**: 17-25.
- Sears MW (2005). Resting metabolic expenditure as a potential source of variation in growth rates of the sagebrush lizard. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* **140**: 171-177.

- Sears MW, Angilletta MJ (2003). Life-history variation in the sagebrush lizard: phenotypic plasticity or local adaptation? *Ecology* **84**: 1624-1634.
- Servedio MR, Noor MAF (2003). The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **34**: 339-364.
- Sexton JP, McIntyre PJ, Angert AL, Rice KJ (2009). Evolution and ecology of species range limits. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **40**: 415-436.
- Shine R (1983). Reptilian viviparity in cold climates: Testing the assumptions of an evolutionary hypothesis. *Oecologia* **57**: 397-405.
- Shine R (2005). Life-history evolution in reptiles. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 23-46.
- Shine R, Harlow PS (1996). Maternal manipulation of offspring phenotypes via nest-site selection in an oviparous lizard. *Ecology* **77**: 1808-1817.
- Shine R, Elphick MJ, Harlow PS (1997). The influence of natural incubation environments on the phenotypic traits of hatchling lizards. *Ecology* **78**: 2559-2568.
- Sih A (1980). Optimal behaviour: can foragers balance two conflicting demands? *Science* **210**: 1041-1043.
- Sih A (1987). Predators and prey lifestyles: an evolutionary and ecological overview. En: WC Kerfoot, A Sih (Eds.). *Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities*. University Press of New England, Hanover, NH.
- Siliceo I, Díaz JA (2010). A comparative study of clutch size, range size, and the conservation status of island vs. mainland lacertid lizards. *Biological Conservation* **143**: 2601-2608.
- Sinervo B (1990). The evolution of maternal investment in lizards: an experimental and comparative analysis of egg size and its effects on offspring performance. *Evolution* **44**: 279-294.
- Sinervo B, Adolph SC (1989). Thermal sensitivity of growth rate in hatchling *Sceloporus* lizards: environmental, behavioural and genetic aspects. *Oecologia* **78**: 411-419.
- Sinervo B, Adolph SC (1994). Growth plasticity and thermal opportunity in *Sceloporus* lizards. *Ecology* **75**: 776-790.
- Sinervo B, Huey RB (1990). Allometric engineering: an experimental test of the causes of interpopulational differences in performance. *Science* **248**: 1106-1109.
- Sinervo B, DeNardo DF (1996). Costs of reproduction in the wild: path analysis of natural selection and experimental tests of causation. *Evolution* **50**: 1299-1313.

- Sinervo B, Licht P (1991). Proximate constraints on the evolution of egg size, number, and total clutch mass in lizards. *Science* **252**: 1300-1302.
- Sinervo B, Doughty P, Huey RB, Zamudio K (1992). Allometric engineering: a causal analysis of natural selection on offspring sizes. *Science* **258**: 1927-1930.
- Singhal S, Moritz C (2012). Testing hypotheses for genealogical discordance in a rainforest lizard. *Molecular Ecology* **21**: 5059-5072.
- Slatkin M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**: 457-462.
- Slatkin M, Hudson RR (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* **129**: 555-562.
- Sorci G, Clobert J, Belichon S (1996). Phenotypic plasticity of growth and survival in the common lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Animal Ecology* **65**: 781-790.
- StatSoft Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com
- Stearns SC (1992). The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.
- Steiner CC, Römler H, Boettger LM, Schöneberg T, Hoekstra HE (2009). The genetic basis of phenotypic convergence in beach mice: similar pigment patterns but different genes. *Molecular Biology and Evolution* **26**: 35-45.
- Storm MA, Angilletta MJ (2007). Rapid assimilation of yolk enhances growth and development of lizard embryos from a cold environment. *Journal of Experimental Biology* **210**: 3415-3421.
- Stuart-Fox DM, Moussalli A, Johnston GR, Owens IPF (2004). Evolution of color variation in dragon lizards: quantitative tests of the role of crypsis and local adaptation. *Evolution* **58**: 1549-1559.
- Stuart-Fox D, Godinho R, Goüy de Bellocq J, Irwin NR, Brito JC, Moussalli A, Široký P, Hugall AF, Baird SJE (2009). Variation in phenotype, parasite load and male competitive ability across a cryptic hybrid zone. *PLOS ONE* **4**: e5677.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.
- Telemeco RS, Radder RS, Baird TA, Shine R (2010). Thermal effects on reptile reproduction: adaptation and phenotypic plasticity in a montane lizard. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**: 642-655.

- Tellería JL, Díaz JA, Pérez-Tris J, de Juana E, de la Hera I, Iraeta P, Salvador A, Santos T (2011). Barrier effects on vertebrate distribution caused by a motorway crossing through fragmented forest landscape. *Animal Biodiversity and Conservation* **34**: 331-340.
- Tellería JL (2012). Introducción a la conservación de las especies. Tundra ediciones, Valencia.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**: 619-633.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.
- Tracy CR, Packard GC, Packard MJ (1978). Water relations in chelonian eggs. *Physiological Zoology* **51**: 378-387.
- True JR (2003). Insect melanism: the molecules matter. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 640-647.
- Uetz P, Etzold T (1996). The EMBL/EBI Reptile Database. *Herpetological Review* **27**: 174-175. <http://www.reptile-database.org/>. Último acceso el 22 de mayo de 2013.
- Valladolid M, González-Fernández JE (2003). Observación de una puesta de *Psammodromus algirus* (L.) en un "arenero artificial" en la provincia de Madrid. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* **14**: 45-47.
- Van Damme R, Bauwens D, Verheyen RF (1990). Evolutionary rigidity of thermal physiology: the case of the cool temperate lizard *Lacerta vivipara*. *Oikos* **57**: 61-67.
- Van Damme R, Bauwens D, Braña F, Verheyen RF (1992). Incubation temperature differentially affects hatching time, egg survival, and hatchling performance in the lizard *Podarcis muralis*. *Herpetologica* **48**: 220-228.
- Veiga JP, Salvador A (2001). Individual consistency in emergence data, a trait affecting mating success in the lizard *Psammodromus algirus*. *Herpetologica* **57**: 99-104.
- Verdú-Ricoy J, Carranza S, Salvador A, Busack SD, Díaz JA (2010). Phylogeography of *Psammodromus algirus* (Lacertidae) revisited: systematic implications. *Amphibia-Reptilia* **31**: 576-582.
- Vernesi C, Pecchioli E, Caramelli D, Tiedemann R, Randi E, Bertorelle G (2002). The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the

- Alps and central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology* **11**: 1285-1297.
- Vignieri SN, Larson JG, Hoekstra HE (2010). The selective advantage of crypsis in mice. *Evolution* **64**: 2153-2158.
- Vitt LJ, Congdon JD, Dickson NA (1977). Adaptive strategies and energetics of tail autotomy in lizards. *Ecology* **58**: 326-337.
- Waddington CH (1952). Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature* **169**: 278-278.
- Waddington CH (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* **7**: 118-126.
- Wang Z, Xia Y, Ji X (2011). Clutch frequency affects the offspring size-number trade-off in lizards. *PLOS ONE* **6**: e16585.
- Warner DA, Shine R (2007). Fitness of juvenile lizards depends on seasonal timing of hatching, not offspring body size. *Oecologia* **154**: 65-73.
- Watterson GA (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* **7**: 256-276.
- Werner EE, Gilliam JF, Hall DJ, Mittelbach GG (1983). An experimental test of the effects of predation risk on habitat use in fish. *Ecology* **64**: 1540-1548.
- West-Eberhard MJ (2003). Developmental plasticity and evolution. Oxford University Press, New York.
- Whiting MJ, Lailvaux SP, Reaney LT, Wymann N (2003). To run or hide? Age-dependent escape behaviour in the common flat lizard (*Platysaurus intermedius wilhelmi*) *Journal of Zoology* **260**: 123-128.
- Wilcox TP, Zwickl DJ, Heath TA, Hillis DM (2002). Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **25**: 361-371.
- Wilson EO (1994). La diversidad de la vida. Editorial Crítica, Barcelona.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**: 323-354.
- Zachos FE (2009). Gene trees and species trees - mutual influences and interdependences of population genetics and systematics. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **47**: 209-218.

Zarza E, Reynoso VH, Emerson BC (2011). Discordant patterns of geographic variation between mitochondrial and microsatellite markers in the Mexican black iguana (*Ctenosaura pectinata*) in a contact zone. *Journal of Biogeography* **38**: 1394-1405.

ANEXOS

Phylogeography of *Psammodromus algirus* (Lacertidae) revisited: systematic implications

Joaquín Verdú-Ricoy^{1,*}, Salvador Carranza², Alfredo Salvador¹,
Stephen D. Busack³, José A. Díaz⁴

Abstract. Relationships among *Psammodromus algirus* populations from the Iberian Peninsula and North Africa, including recently described *P. jeanneae* and *P. manuelae*, were estimated from mitochondrial DNA gene sequences. This enlarged data set confirmed the presence of two divergent eastern and western mitochondrial DNA lineages on the Iberian Peninsula, the distributions for which are separated by a narrow zone of contact across the centre of the Peninsula. Paratypes of *P. jeanneae* and topotypes of *P. manuelae* represent southern and northern clades of the western lineage, respectively, making *P. algirus* paraphyletic. This, together with the low level of allozymic and mitochondrial DNA substructuring within western populations, is not sufficient to retain *P. jeanneae* and *P. manuelae* as valid species, and we relegate them to the status of junior synonyms of *P. algirus*.

Keywords: Iberian Peninsula, lacertid lizards, mitochondrial DNA, *Psammodromus algirus*, *Psammodromus jeanneae*, *Psammodromus manuelae*.

Since its original designation as a species in 1758, *Psammodromus algirus* has been considered representative of a single, invariant, species throughout the Iberian Peninsula. Recently, however, Carranza et al. (2006) demonstrated that *P. algirus* in Iberia was actually comprised of eastern and western mtDNA clades. Working independently of Carranza et al., Busack and Lawson (2006) noted mtDNA differentiation and allozyme differentiation between northern and southern Iberian populations (2006: figs 2 and 3, respectively), and later described *P. manuelae* from Manzanares el Real (Madrid province) and *P. jeanneae* from 25.6 km NE of Facinas (Cádiz province) following a morphological analysis (Busack, Salvador and

Lawson, 2006). In this analysis we utilize DNA sequences from seven mitochondrial genes and take advantage of a larger, more robust, specimen sample including the holotype and paratypes of *P. jeanneae* and topotypes of *P. manuelae* to revisit the phylogeography of Iberian *P. algirus*. This expanded data set allows us to infer genetic relationship among populations of *P. algirus*, *P. manuelae* and *P. jeanneae* throughout much of its current geographical range on Iberia and to revise the taxonomy of this group with special reference to the status of *P. manuelae* and *P. jeanneae*.

A total of 104 individuals from 68 populations, including most samples used by Carranza et al. (2006) and Busack and Lawson (2006), the holotype and one paratype of *Psammodromus jeanneae* (E232055 and 232056, respectively), topotypes of *P. manuelae* (E232060 and 232062) and 32 specimens from 16 previously unsampled populations (fig. 1), were sequenced. *Psammodromus h. hispanicus* from Encinasola (Huelva province) and *P. h. edwardsianus* from Sierra de Baza (Granada province) served as outgroups (following Carranza et al., 2006).

Total genomic DNA was extracted from ~40 mg of tissue using the Qiagen BioSprint 15 DNA Kit[®] following the manufacturer's protocol. Resulting DNA was visually inspected after migration on agarose gels and quantified with a NanoDrop spectrophotometer. Amplifications were performed in 50 μ l of 1 \times reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 0.4 μ M each primer, 0.2 mM each dNTP, 1.25 U of Go-Taq Flexi DNA Polymerase (Promega), and 3 μ l of previously extracted DNA (50-100 ng). A 709 bp fragment of

1 - Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain

2 - Instituto de Biología Evolutiva, CSIC-UPF, Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003 Barcelona, Spain

3 - North Carolina State Museum of Natural Sciences, 11 West Jones Street, Raleigh, NC 27601-1029, USA

4 - Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense, E-28040 Madrid, Spain

*Corresponding author; e-mail: jvrcoy@mncn.csic.es

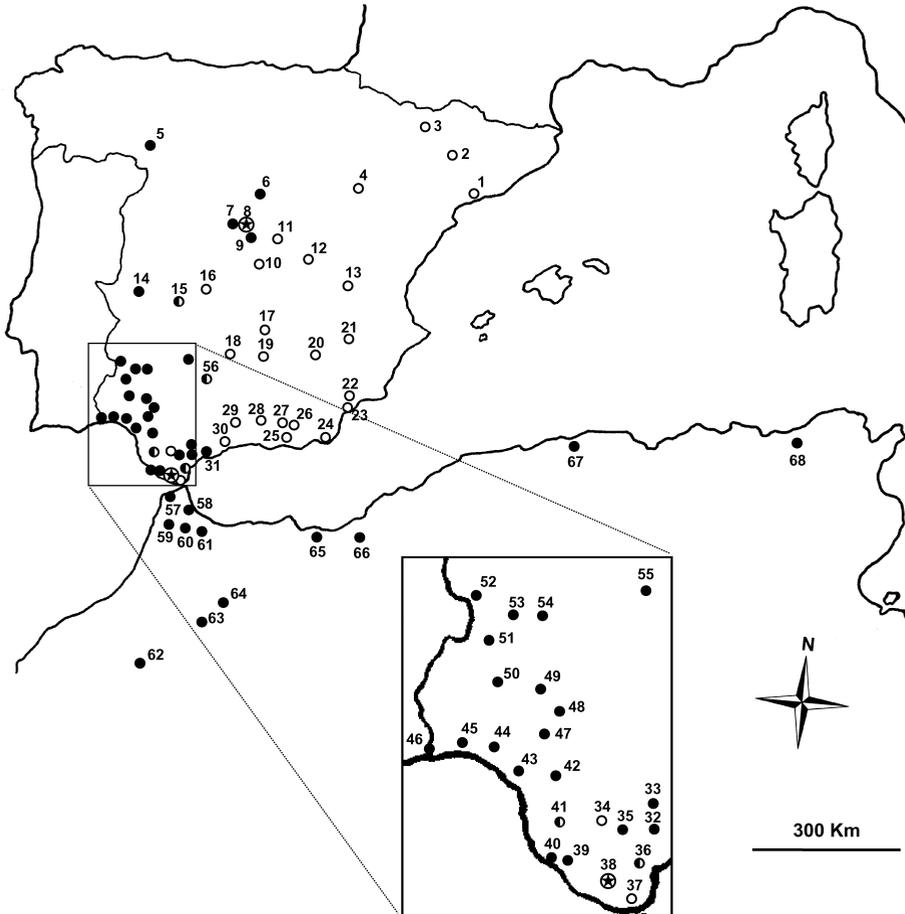


Figure 1. Localities sampled; solid symbols represent the western lineage, open symbols represent the eastern lineage and half-solid symbols indicate localities representing both lineages (type localities for *P. manuae* [8] and *P. jeanneae* [38] highlighted with asterisk). Locality Key: SPAIN: TARRAGONA: (1) Tarragona. LERIDA: (2) Tartareu. HUESCA: (3) Ainsa. ZARAGOZA: (4) El Frasno. ZAMORA: (5) Cabañas de Tera. SEGOVIA: (6) Sotos de Sepúlveda. MADRID: (7) Navacerrada, (8) Manzanares el Real, (9) El Pardo, (10) Aranjuez. GUADALAJARA: (11) Pioz. CUENCA: (12) Torrejoncillo del Rey, (13) Hoces del Cabriel. CACERES: (14) Santiago del Campo, (15) Villuercas. TOLEDO: (16) Espinoso del Rey. CIUDAD REAL: (17) Valdepeñas, (18) Solana del Pino. JAEN: (19) Despeñaperros. ALBACETE: (20) Embalse Fuensanta, (21) Embalse de Bayco. MURCIA: (22) Morata, (23) Águilas. ALMERIA: (24) Cabo de Gata, (25) Sierra Gador, (26) Abruena. GRANADA: (27) La Calahorra, (28) Cortijo del Ciprés, (29) Dehesa de los Montes. MALAGA: (30) Málaga, (31) Marbella, (32) Sierra Bermeja, (33) Genaguacil, (34) La Saucedá, (35) Río Hozgarganta. CADIZ: (36) Castellar de la Frontera, (37) Getares, (38) Facinas, (39) Barbate, (40) Caños de Meca, (41) Medina Sidonia. SEVILLA: (42) Lebrija, (47) Cañada de los Pájaros, (48) Gelves, (49) Gerena. HUELVA: (43) Matalascañas, (44) Bodegones, (45) El Portil, (46) Ayamonte, (50) Berrocal, (51) Linares de la Sierra. BADAJOZ: (52) Oliva de la Frontera, (53) Tentudia, (54) Pallarés. CORDOBA: (55) Doña Rama, (56) Virgen de la Cabeza. MOROCCO: (57) Tangier, (58) Ued Lau, (59) Chefchaouen, (60) Jebala, (61) Bab-Berret, (62) Beni-Mellal, (63) Boulemane, (64) Middle Atlas, (65) Berkana. ALGERIA: (66) Tlemcen, (67) Sidi Feredj. TUNISIA: (68) Ain Draham.

the fourth subunit of the NADH dehydrogenase mitochondrial gene (ND4) and adjacent tRNA^{His} (68 bp), tRNA^{Ser} (67 bp) and tRNA^{Leu} (48 bp) were amplified using primers ND4 and Leu (Arévalo, Davis and Sites, 1994). PCR consisted of 3-min pre-denaturing step at 94°C, followed by 35 cycles of denaturing for 30 sec at 94°C, primer annealing for 30 sec at 54°C and elongation for 40 sec at 72°C with a final

4-min elongation step at 72°C. Fragments of the mitochondrial cytochrome *b* gene (CytB, 300 bp), 12S rRNA (363 bp) and 16S rRNA (410 bp) were amplified using primers cyt1 and cyt2 (Palumbi, 1996), 12Sa and 12Sb (Kocher et al., 1989), and 16Sa and 16Sb (Palumbi, 1996), respectively. PCR consisted of a 5-min pre-denaturing step at 94°C, followed by 35 cycles of denaturing for 30 sec at 94°C, anneal-

ing primers for 45 sec at 48°C and elongation for one min at 72°C with a final 5-min elongation step at 72°C. PCR effectiveness was visually quantified after migration of PCR products on agarose gels. PCR products were purified by an ammonium acetate/ethanol cleaning process and sequenced using the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle sequencing protocol in an ABI Prism 310 automated sequencer (Applied Biosystems).

All sequence chromatograms were edited with Sequencer (v. 4.2.2, Gene Codes). Once corrected, sequences were aligned independently for each gene with CLUSTALX (Thompson et al., 1997) under program default parameters (opening gap = 10; gap extension = 0.2) and visually inspected with Bioedit v.7.0.5 (Hall, 2005). Topological incongruence among partitions was tested using the incongruence length difference (ILD) test (Michkevich and Farris, 1981; Farris et al., 1994). In this test, 10,000 heuristic searches were carried out after removing all invariable characters from the data set (Cunningham, 1997). To test for incongruence among data sets, we also used a reciprocal 70% bootstrap proportion or a 95% posterior probability threshold (Mason-Gamer and Kellogg, 1996). Topological conflicts were considered significant if two different relationships for the same set of taxa were each supported. Results of all tests indicated that independent data sets were not incongruent (data not shown) and therefore a combined analysis involving 7 mitochondrial genes (ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB-12S-16S) was carried out. For many samples, however, it was not possible to amplify 12S and 16S genes and a smaller data set including only 5 genes (ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB) was also elaborated.

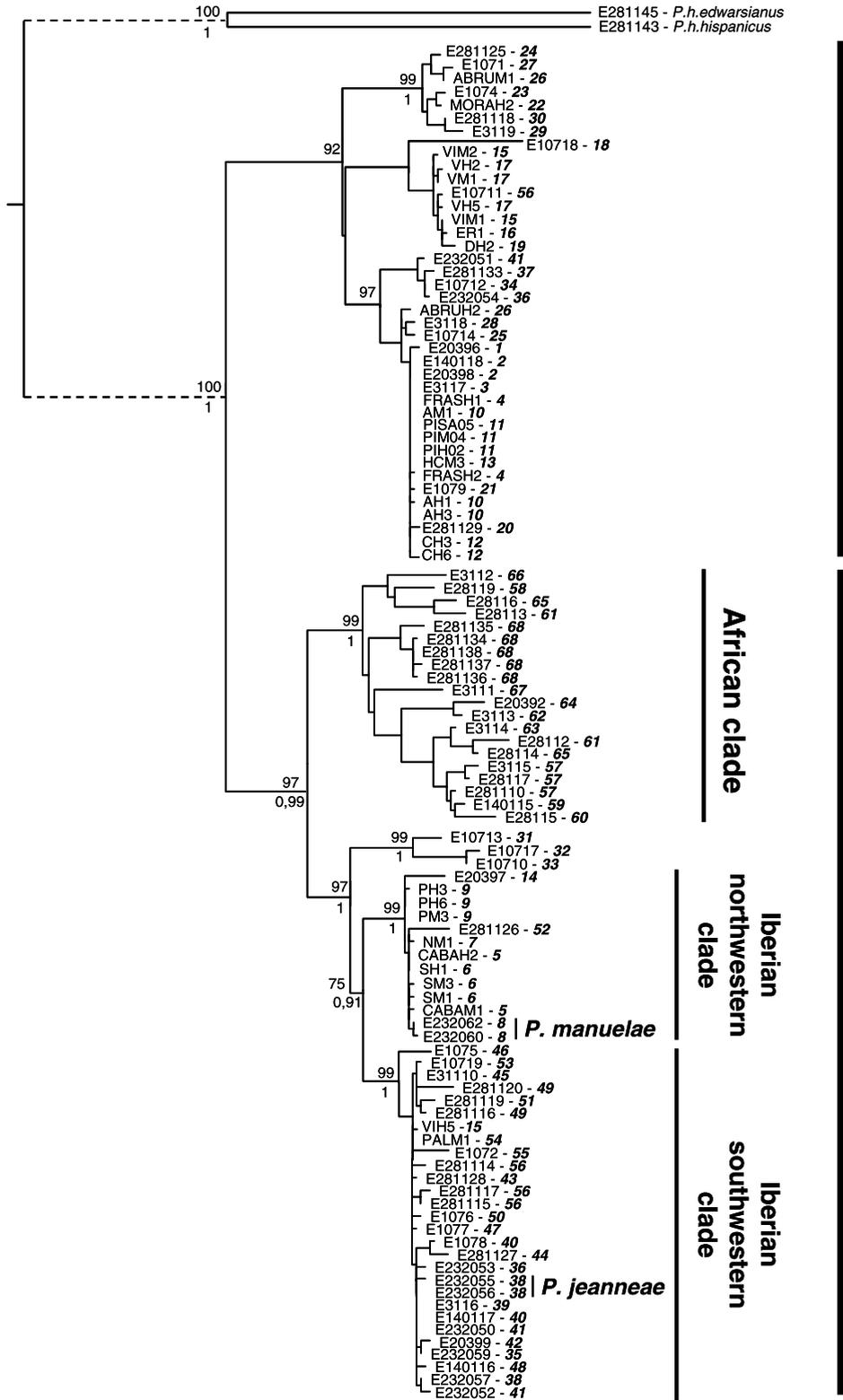
Phylogenetic trees were inferred using Maximum-Likelihood (ML; Felsenstein, 1981) and Bayesian methods. The most appropriate model of sequence evolution was determined with jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) using the Akaike information criterion. In the Bayesian analyses each partition had its evolutionary model and these were: the HKY for tRNA^{His} and tRNA^{Leu}, HKY+G for tRNA^{Ser} and 16S, GTR+G for ND4 and 12S, and GTR+I+G for CytB. ML analyses were performed using PhyML version 2.4.3 (Guindon and Gascuel, 2003), with model parameters fitted to the data by likelihood maximization. In this case a single model of sequence evolution was selected for each concatenated data set (5 genes and 7 genes). In both cases the best model was the GTR + I + G. Reliability of the ML trees was assessed by bootstrap analysis with 1000 replications (Felsenstein, 1985). Bayesian analyses were performed with MrBayes version 3.0b4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003) for 2.5×10^6 generations, with a sampling frequency of 100 generations. After verifying that stationarity had been reached in terms of likelihood scores and parameter estimation, the first 5000 trees for the two data sets were discarded from both runs and independent majority-rule consensus trees were generated from the remaining (post burn-in) trees. The frequency of any particular clade of the consensus tree represents the posterior probability of that node (Huelsenbeck and Ronquist, 2001); only values equal to or greater than 95% were considered to

indicate that nodes were significantly supported (Wilcox et al., 2002).

The ILD test indicated that the 7 gene partitions (ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB-12S-16S) were not incongruent ($P = 0.23$); analyses of independent partitions confirmed there were no topological conflicts (Mason-Gamer and Kellogg, 1996) and two independent data sets of mitochondrial fragments were combined for further analysis. The first data set included 1192 bp for ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB from 104 individuals in which 318 bp were variable and 236 bp were parsimony-informative, and the second was comprised of 1965 bp for ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB-12S-16S from 46 individuals in which 459 bp were variable and 319 bp were parsimony-informative. All sequence data not currently available in GenBank will be added upon publication (see figs 2 and 3 for specimen identification information).

Results of Maximum-Likelihood (ML) and Bayesian analyses are illustrated in fig. 2 (ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB) and fig. 3 (ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB-12S-16S). Each method and dataset produced trees with very similar topologies. Log-likelihood values of the trees obtained by ML for ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB and ND4-tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-CytB-12S-16S combinations were -5824.03 and -6584.01 , respectively.

These data confirm that *Psammodromus algirus* consists of two well-supported, reciprocally monophyletic, mitochondrial lineages (Carranza et al., 2006); an eastern lineage confined to Iberia, and a western lineage present in both Iberia and North Africa (figs 1-3). This analysis, which includes a larger and more geographically-representative sample of individuals and a more robust mitochondrial sampling than Carranza et al. (2006), strongly supports the African clade as being sister to the western lineage on Iberia. Iberian representatives of the western lineage are partitioned into three groups: a basal clade restricted to three



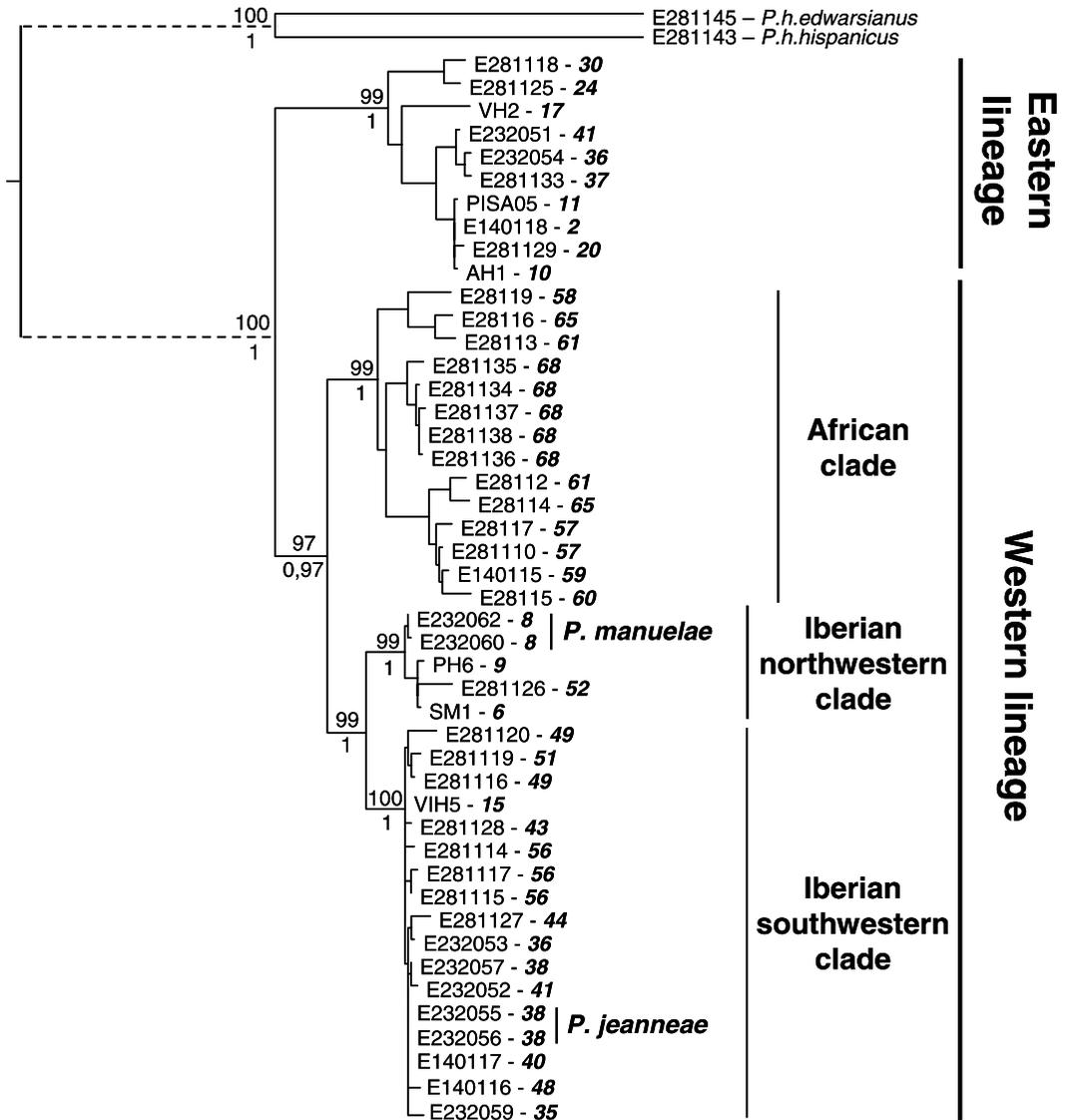


Figure 3. Estimate of relationships of *Psammudromus algirus*, *P. jeanneae* and *P. manuelae* derived from ML and Bayesian analyses using ND4, tRNA^{His}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}, CytB, 12S and 16S (see text for details). Numbers above and below nodes represent bootstrap support (>70%) for ML analysis and Posterior Probabilities (>0.95) for Bayesian analyses (not shown in polytomous nodes), respectively. Dashed lines indicate basal branch lengths not proportional to total number of changes. Numbers after specimens refer to the geographic locations shown in fig. 1. Plain text letter and number allocation identifies individuals; boldface number refers to locality on fig. 1.

Figure 2. Phylogenetic relationship of *Psammudromus algirus*, *P. jeanneae* and *P. manuelae* derived from ML and Bayesian analyses using ND4, tRNA^{His}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu} and CytB (see text for details). Numbers above and below nodes represent bootstrap support (>70%) from ML analysis and Posterior Probabilities (>0.95) for Bayesian analysis (not shown in polytomous nodes), respectively. Dashed lines indicate basal branch lengths not proportional to total number of changes. Plain text letter and number allocation identifies individuals; boldface number refers to locality on fig. 1.

samples from southern localities, and two main northwestern and southwestern clades (figs 2-3). Colonization of the African continent occurred after differentiation between the western and eastern lineages on Iberia, but before the split between southwestern and northwestern clades within the western lineage.

Phylogenetic analyses clearly place the type specimens of *Psammodromus jeanneae* in the southwestern clade of the western lineage and specimens of *P. manuelae* from Manzanares el Real (Madrid province, the type locality) in the northwestern clade (figs 2 and 3). If *P. jeanneae* and *P. manuelae* were, in fact, well-differentiated species, *P. algirus* would be a paraphyletic unit. Within the western clade, however, whose African populations are associated with *P. algirus*, the level of genetic substructuring is much lower than that between western and eastern clades (Carranza et al., 2006; this study) and our molecular data (figs 2 and 3) do not support *P. jeanneae* and *P. manuelae* as well-differentiated species. As a result, we hereby relegate these names to the status of junior synonyms of *P. algirus*.

Our greater geographic coverage, relative to that initially reported by Carranza et al. (2006) and Busack and Lawson (2006), allows us to reject the hypothesis that variation in mtDNA haplotypes is gradual. Currently available data do, however, suggest that highly divergent colour patterns in *Psammodromus algirus* are found in central Spain and in three northeastern populations (Carretero, 2002). If such (or other) phenotypic differences were consistent on a broader geographical scale, the eastern lineage of *P. algirus* might represent a separate species. Combined, this information suggests that ecological or behavioural mechanisms may be currently acting to maintain differentiation, resulting in a relatively narrow contact zone between eastern and western lizards across the centre of the Iberian Peninsula (fig. 1). Additional work, which should include studies of nuclear markers (Godinho et al., 2008) and proper morphometric analyses of these clades, is needed to fully

understand genetic and phenotypic variation between and within these lineages, especially at contact zones.

Acknowledgements. Financial support from the projects CGL2007-02744/BOS and CGL2009-11663/BOS was provided by the Spanish Ministry of Education and Science, and we thank J.L. Roca and R. García for laboratory assistance. Lizard samples were collected under appropriate permits from Andalucía, Aragón, Castilla y León, Madrid, Castilla La Mancha, Extremadura, and Murcia.

References

- Arévalo, E., Davis, S.K., Sites, J.W. (1994): Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Syst. Biol.* **43**: 387-418.
- Busack, S.D., Lawson, R. (2006): Historical biogeography, mitochondrial DNA, and allozymes of *Psammodromus algirus* (Lacertidae): a preliminary hypothesis. *Amphibia-Reptilia* **27**: 181-193.
- Busack, S.D., Salvador, A., Lawson, R. (2006): Two new species in the genus *Psammodromus* (Reptilia: Lacertidae) from the Iberian Peninsula. *Ann. Carnegie Mus.* **75**: 1-10.
- Carranza, S., Harris, D.J., Arnold, E.N., Batista, V., González de la Vega, J.P. (2006): Phylogeography of the lacertid lizard, *Psammodromus algirus*, in Iberia and across the Strait of Gibraltar. *J. Biogeogr.* **33**: 1279-1288.
- Carretero, M.A. (2002): Sources of colour pattern variation in Mediterranean *Psammodromus algirus*. *Netherlands J. Zool.* **52**: 43-60.
- Cunningham, C.W. (1997): Is congruence between data partitions a reliable predictor of phylogenetic accuracy? Empirically testing an iterative procedure for choosing among phylogenetic methods. *Syst. Biol.* **46**: 464-478.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C. (1994): Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**: 315-319.
- Felsenstein, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Godinho, R., Crespo, E.G., 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.
- Guindon, S., Gascuel, O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**: 696-704.
- Hall, T. (2005): Bioedit. Carlsbad, CA, Ibis Therapeutics.

- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.R. (2001): MrBayes: Bayesian inference of the phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- 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.
- Mason-Gamer, R.J., Kellogg, E.A. (1996): Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramynea). *Syst. Biol.* **45**: 524-545.
- Michkevich, M.F., Farris, J.S. (1981): The implications of congruence in Menidia. *Syst. Zool.* **30**: 351-370.
- Palumbi, S.R. (1996): Nucleic acids. II: the polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics*, p. 205-247. Hillis, D., Moritz, C., Mable, B.K., Eds, Sunderland, MA, Sinauer Associates.
- Posada, D. (2008): jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1253-1256.
- Ronquist, F.R., Huelsenbeck, J.P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997): The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- Wilcox, T.P., Zwickl, D.J., Heath, T.A., Hillis, D.M. (2002): Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Mol. Phyl. Evol.* **25**: 361-371.

Received: May 7, 2010. Accepted: June 18, 2010.

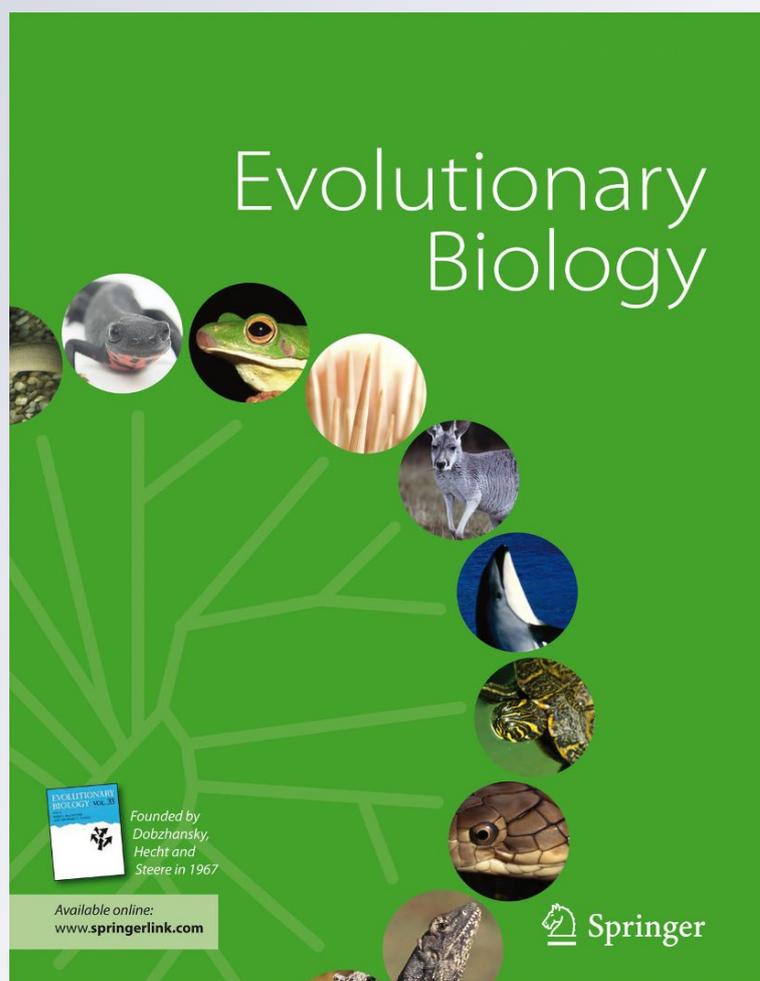
Intraspecific Variation of Reproductive Traits in a Mediterranean Lizard: Clutch, Population, and Lineage Effects

José A. Díaz, Pablo Iraeta, Joaquín Verdú-Ricoy, Ignacio Siliceo & Alfredo Salvador

Evolutionary Biology
Evolutionary Biology

ISSN 0071-3260
Volume 39
Number 1

Evol Biol (2012) 39:106-115
DOI 10.1007/s11692-011-9144-5



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Intraspecific Variation of Reproductive Traits in a Mediterranean Lizard: Clutch, Population, and Lineage Effects

José A. Díaz · Pablo Iraeta · Joaquín Verdú-Ricoy ·
Ignacio Siliceo · Alfredo Salvador

Received: 5 September 2011 / Accepted: 28 October 2011 / Published online: 10 November 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Widely distributed terrestrial ectotherms from the southern European peninsulas show patterns of subdivision (related to isolation in temperate refugia) that allow us to test the relative importance of phylogeographic lineage, population of origin and familial effects as sources of variation for life-history traits. We collected gravid females from 15 geographically separated populations of the lacertid lizard *Psammotromus algirus*, a widely distributed species with well differentiated eastern and western lineages. We incubated eggs under two treatments of constant (28°C) and fluctuating (28 ± 4°C) temperature, and we examined clutch, population, and lineage effects on several traits of females, eggs, and hatchlings. Incubation time was mainly explained by differences between lineages, but it was also influenced by population and female effects. Within each lineage, incubation was shorter at cooler and wetter sites, and for a given climate it was shorter for eastern than for western populations, suggesting that countergradient variation has evolved independently in the two lineages. Female size, clutch size, and relative fecundity were primarily influenced by inter-population differences, a pattern that seemed attributable to environmental differences in productivity, because mean female size was positively correlated with a gradient of increasing precipitation and decreasing temperature. Clutch size was

mainly, but not entirely, dependent on female SVL, suggesting both a proximate effect of local conditions and intrinsic differences among populations. Females from drier and warmer sites produced larger hatchlings. Mean egg mass was mainly determined by familial effects. Eggs incubated at a constant temperature hatched earlier than did their siblings incubated at fluctuating temperatures, a fact that could be explained by considering that in Mediterranean environments developmental rate might increase at a lower speed above average incubation temperature than it does decrease below it.

Keywords Egg size · Clutch size · Life-history · Incubation temperature · Trade-offs

Introduction

Life-histories can be defined as coadapted suites of traits that determine how much energy an organism allocates to reproduction, versus the competing demands of maintenance and growth, and how this reproductive investment is divided among individual offspring (Stearns 1992; Roff 1992). These trait combinations are presumed to be adjusted to the environment by natural selection. For example, models predict that once the amount of resources allocated to reproduction is fixed, natural selection can still shape the partitioning of that investment into a few large offspring or many small ones (Lack 1954; Sinervo and Licht 1991; Stearns 1992). If juveniles suffer higher mortality rates, the strategy of producing more but smaller offspring should be selected, whereas in environments where large juveniles have a clear survival advantage, offspring size should increase, and clutch size decrease (Sinervo 1990). In oviparous species, another trait that has

J. A. Díaz (✉) · P. Iraeta · J. Verdú-Ricoy · I. Siliceo
Departamento de Zoología y Antropología Física (UD
Vertebrados), Facultad de Biología, Universidad Complutense,
28040 Madrid, Spain
e-mail: jadiaz@bio.ucm.es

J. Verdú-Ricoy · A. Salvador
Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de
Ciencias Naturales, MNCN-CSIC, José Gutiérrez Abascal 2,
28006 Madrid, Spain

significant evolutionary consequences and responds readily to environmental gradients is incubation time, which tends to shorten in cool climates until viviparity eventually evolves (Shine 1983, 2005; Telemeco et al. 2010). Thus, variation in life-history traits is widespread, and it spans all levels of biological organization, from individuals to populations, species, and higher taxa. It is therefore important to quantify the relative amount of variation that can be associated with these different levels, and to establish what part of it is most likely to represent phylogenetic, genetic, and/or environmental effects.

To accomplish this goal, several procedures can be employed. At the interspecific level, the analysis of phenotypic variation using phylogenetic comparative methods has dominated the literature (Felsenstein 1985; Harvey and Pagel 1991). These methods allow us to distinguish whether the sharing of life-history traits is due to common ancestry, or to convergent adaptation or plasticity (Felsenstein 1985; Miles and Dunham 1992; Bauwens and Díaz-Uriarte 1997; Siliceo and Díaz 2010). At the intraspecific level, common-garden experiments and reciprocal transplant approaches allow discriminating between environmental and population-specific sources of geographic variation in the phenotypic traits examined (Qualls and Shine 2000; Lorenzon et al. 2001; Iraeta et al. 2006). In addition, captive breeding of wild-caught females allows estimating within-population familial effects. On the other hand, intraspecific molecular phylogenies, which are becoming increasingly common, provide information about the phylogeographic history of populations (Avise 1989), allowing us to address the role of ancestry in population differentiation.

Squamate reptiles provide excellent model systems for studying the evolution of life-histories because the two main consequences of terrestrial ectothermy, low energy demands and behavioral thermoregulation, have had major evolutionary effects (Shine 2005). For example, reproducing females can manipulate incubation temperatures either by selecting appropriate nest sites (Shine and Harlow 1996; Iraeta et al. 2007) or by retaining developing eggs, which has resulted in multiple evolutionary transitions from oviparity to viviparity. In addition, freedom from heat-conserving constraints on body size allows producing small propagules in large numbers (Shine 2005). This promotes a dynamic matching of life-histories to local environments, which can be a result of proximate effects (such as thermal opportunities or food availability) or of genetically based responses to geographically variable selective regimes (Ballinger 1983; Sinervo and Adolph 1989; Adolph and Porter 1993; Ferguson and Talent 1993; Iraeta et al. 2006). This flexibility has generated a large amount of intraspecific variation, which has led to a growing number of studies focusing on the population level

(e.g. Adolph and Porter 1993; Forsman and Shine 1995; Niewiarowski et al. 2004).

Within this context, widely distributed species of lacertid lizards from the southern Mediterranean peninsulas provide a valuable opportunity to understand the causes of variation in reproductive traits. Evidence from molecular markers indicates that the Iberian, Italian and Balkan peninsulas functioned as refugia for many species during the ice ages (Taberlet et al. 1998; Hewitt 1999). Surveys of genetic variation have shown patterns of subdivision related to isolation in temperate refugia during the glacial stages, and demographic and geographical expansions during postglacial events (Taberlet et al. 1998; Hewitt 1999; Milá et al. 2000; Lessa et al. 2003). This ancient diversification combines with the low dispersal ability of terrestrial ectotherms, that must adapt to local conditions or track the changing distribution of suitable habitat, to provide an additional source of variation for testing hypotheses about the evolution of life-histories.

In this study, we collected gravid females of the widely distributed lacertid lizard *Psammotriton algirus* from 15 geographically separated populations covering most of the Iberian range of this species, and we gathered climatic data from nearby meteorological stations to frame intraspecific variation within the context of bioclimatic gradients. Intraspecific variation in life-history traits has been documented for *P. algirus*: recent studies have revealed significant effects of habitat fragmentation on reproductive investment (Díaz et al. 2005), differences in reproductive traits between populations located at the core and the periphery of the species' range (Díaz et al. 2007), and variation in growth rates between nearby populations living at different elevation (Iraeta et al. 2006). In addition, molecular data show that *P. algirus* comprises two well differentiated mitochondrial DNA lineages separated by a narrow contact zone (Carranza et al. 2006; Verdú-Ricoy et al. 2010), suggesting an ancient divergence together with some type of isolation mechanism between them. Taking advantage of all this previous knowledge, we addressed the following hypotheses: (1) because environmental differences are the main source of variation for growth rates, overriding familial effects (Iraeta et al. 2006), we expect that female body size and related life-history traits (e.g. clutch size; Brandt and Navas 2011) will mainly be influenced by inter-population climatic differences; we predict that population effects will exceed those attributable to ancestry (i.e. differences between lineages), with positive correlations between population means and environmental productivity measurements; (2) because larger propagules will have a survival advantage where conditions for juvenile growth are poor (Roff 1992; Johnston and Leggett 2002; Iraeta et al. 2006, 2008), we hypothesize that egg and hatchling size will vary among populations, and that

population averages will show negative correlations with environmental productivity; and (3) because incubation time is strongly dependent on temperature (Iraeta et al. 2007) and can have an important effect on hatching time and hence fitness (Warner and Shine 2007), we hypothesize that lizards from cooler sites will have shorter incubation periods to compensate for lower incubation temperatures (Oufiero and Angilletta 2006; Díaz et al. 2007).

Materials and Methods

Study Species

Psammotromus algirus (Linnaeus, 1758) is a medium-sized (adult snout-vent length 60–90 mm; mass 6–16 g), heliothermic, insectivorous lacertid that inhabits shrub and woodland habitats of the Iberian Peninsula, south-eastern coastal region of France and north-west Africa (Arnold 1987; Díaz and Carrascal 1991). In central Spain, its altitudinal range is approximately 450–1,400 m. Hibernation takes place from October to February. Courtship and egg-laying occur between April and June, and hatchlings are born in August–September (Veiga and Salvador 2001).

Study Sites

During the springs of 2006, 2008, and 2009, we captured adult lizards from 15 populations across the distribution range of *Psammotromus algirus* in Spain (Fig. 1; Table 1). According to mitochondrial DNA gene sequences, there are two divergent eastern and western lineages on the Iberian Peninsula (Carranza et al. 2006), the distributions for which are separated by a narrow contact zone across the centre of the Peninsula (Verdú-Rico et al. 2010). Of our 15 populations, nine belong to the eastern lineage, five belong to the western lineage, and one (Villuercas) has haplotypes from both lineages (Fig. 1). For each location, we registered latitude, altitude, and mean temperature and precipitation during the activity period of *P. algirus* (March–October). These latter data were obtained from the nearest stations in the Spanish Meteorological Agency (AEMET) network.

Husbandry of Adults, Eggs and Juveniles

All individuals were captured and transported to the Department of Zoology at the Universidad Complutense de Madrid, where they were weighed and measured (snout-vent length, SVL). Lizards were housed in white opaque wall terraria (two females and one male per cage) covered by a green net that prevented escape, let daylight enter the cages, and provided a shrubby-like shelter. Terraria were

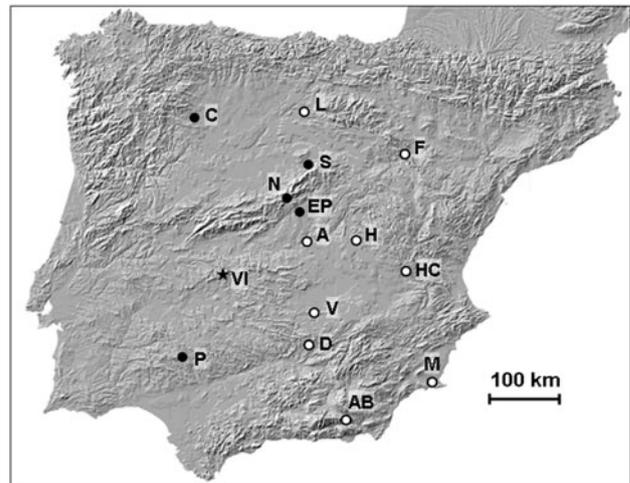


Fig. 1 Populations of *P. algirus* used in this study. Zamora: Cabañas de Tera (C). Burgos: Lerma (L). Zaragoza: El Frasno (F). Segovia: Sotos de Sepúlveda (S). Madrid: Navacerrada (N), El Pardo (EP), Aranjuez (A). Cuenca: Horcajada de la Torre (H), Hoces de Cabriel (HC). Ciudad Real: Valdepeñas (V). Badajoz: Palarés (P). Almería: Abucena (AB). Murcia: Morata (M). Jaén: Despeñaperros (D). Cáceres: Villuercas (VI). *Solid circles* represent populations from the western mtDNA lineage, whereas *open circles* indicate localities from the eastern lineage. Villuercas (*asterisk*) has haplotypes from both lineages

filled with moistened earth covered by leaf litter. A 60 W lamp suspended over one end of the cage created a photothermal gradient (circa 25–50°C) allowing thermo-regulation within the preferred temperature range (Díaz and Cabezas-Díaz 2004). Lizards were fed crickets (*Acheta domesticus*) and mealworms (*Tenebrio molitor*), dusted with a commercial vitamin and calcium supplement. All cages were watered ad libitum. In our study species, gravid females readily lay eggs in captivity, whereas their reproductive output reflects the environmental conditions experienced in the field during the early stages of vitellogenesis (i.e. when the physiological coupling among clutch size, egg size and clutch mass occurs; Sinervo and Licht 1991). Gravid females were daily monitored to detect egg-laying. When a female had laid, it was removed from the cage and the eggs were carefully searched for. Upon finding the clutch, eggs were counted, weighed and individually placed in 150 ml closed plastic cups filled with ca. 35 g of moistened vermiculite (10 g vermiculite: 8 g water, equivalent to -200 kPa; Tracy et al. 1978). All clutches were laid between 19 May and 29 June, and females were released at their site of capture shortly after laying.

We used a split-clutch design to distribute eggs over two incubators (Friocell, Königswinter, Germany) set at an average temperature of 28°C, one of which had a constant temperature treatment ($28 \pm 0.1^\circ\text{C}$) whereas the other one had a daily thermal cycle ranging between a minimum value of 24°C between 0 and 6 h, and a maximum value of

Table 1 Altitude, latitude, mean temperature between March and October (T), total precipitation between March and October (P), and reproductive characteristics (mean \pm SD, with sample size between brackets) for the fifteen lizard populations studied

Population	Altitude (m asl)	Latitude ($^{\circ}$ N)	T ($^{\circ}$ C)	P (mm)	PCI	Female SVL (mm)	Clutch size	Residuals of log-clutch size on log-SVL	Egg mass (g)	Incubation time (days)	Hatchling mass (g)	Hatchling SVL (mm)	Residuals of hatchling SVL on egg mass	Residuals of hatchling mass on hatchling SVL
Abrucena (AB)	1,070	3.7.12	16.04	173.1	-0.437	73.4 \pm 6.3 (8)	5.8 \pm 0.8 (5)	-0.006 \pm 0.178 (5)	0.43 \pm 0.04 (23)	56.3 \pm 1.4 (23)	0.56 \pm 0.05 (23)	30.1 \pm 0.9 (23)	0.017 \pm 0.023 (23)	0.021 \pm 0.069 (23)
Aranjuez (A)	594	40.00	17.89	249.6	-0.726	67.2 \pm 4.3 (6)	5.0 \pm 0.0 (2)	0.162 \pm 0.170 (2)	0.34 \pm 0.02 (6)	58.7 \pm 0.5 (6)	0.47 \pm 0.04 (6)	28.4 \pm 0.5 (6)	-0.004 \pm 0.020 (6)	-0.014 \pm 0.083 (6)
Cabañas de Tera (C)	780	42.01	14.30	275.9	0.624	81.3 \pm 5.7 (9)	6.4 \pm 1.6 (9)	-0.094 \pm 0.095 (9)	0.42 \pm 0.04 (48)	59.5 \pm 1.3 (48)	0.58 \pm 0.04 (48)	30.5 \pm 0.8 (48)	0.032 \pm 0.021 (48)	0.027 \pm 0.062 (48)
Horejada (H)	943	40.03	17.00	344.7	0.312	77.5 \pm 7.6 (6)	7.4 \pm 3.4 (5)	0.075 \pm 0.214 (5)	0.38 \pm 0.03 (25)	54.1 \pm 1.2 (25)	0.45 \pm 0.04 (25)	28.2 \pm 0.6 (25)	-0.028 \pm 0.027 (25)	-0.046 \pm 0.077 (25)
Despeñaperros (D)	592	38.37	18.10	259.5	-1.001	72.6 \pm 4.8 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
El Frasno (F)	740	41.42	15.86	256.5	0.118	81.8 \pm 3.7 (8)	7.8 \pm 1.4 (8)	0.084 \pm 0.170 (8)	0.37 \pm 0.06 (52)	56.4 \pm 1.2 (52)	0.48 \pm 0.05 (52)	29.2 \pm 0.9 (52)	0.012 \pm 0.03 (52)	-0.066 \pm 0.087 (52)
Hoces del Cabriel (HC)	720	39.54	17.48	277.4	-0.438	72.7 \pm 2.6 (10)	4.6 \pm 0.5 (9)	-0.115 \pm 0.084 (9)	0.42 \pm 0.03 (30)	56.8 \pm 1.4 (30)	0.54 \pm 0.04 (30)	29.5 \pm 0.7 (30)	-0.004 \pm 0.028 (30)	0.036 \pm 0.073 (30)
Lerma (L)	940	42.13	13.79	347.5	1.238	80.5 \pm 4.8 (6)	8.2 \pm 1.6 (5)	0.153 \pm 0.052 (5)	0.42 \pm 0.09 (31)	53.5 \pm 1.3 (31)	0.51 \pm 0.07 (31)	28.6 \pm 1.0 (31)	-0.032 \pm 0.03 (31)	0.038 \pm 0.106 (31)
Morata (M)	660	37.59	18.35	217.9	-1.225	67.5 \pm 3.1 (6)	5.3 \pm 1.5 (3)	0.187 \pm 0.414 (3)	0.34 \pm 0.04 (11)	57.9 \pm 1.5 (11)	0.46 \pm 0.02 (11)	28.6 \pm 1.0 (11)	0.001 \pm 0.026 (11)	-0.061 \pm 0.083 (11)
Navacerrada (N)	1,230	40.72	12.96	513.0	2.190	77.8 \pm 2.3 (6)	7.0 \pm 1.0 (3)	0.070 \pm 0.120 (3)	0.34 \pm 0.02 (15)	58.8 \pm 1.4 (15)	0.43 \pm 0.02 (15)	27.4 \pm 0.7 (15)	-0.044 \pm 0.023 (15)	-0.014 \pm 0.059 (15)
Pallarés (P)	600	38.06	19.10	331.6	-0.956	81.5 \pm 3.7 (8)	7.7 \pm 0.5 (6)	0.049 \pm 0.124 (6)	0.41 \pm 0.07 (39)	62.4 \pm 1.7 (39)	0.53 \pm 0.07 (39)	29.8 \pm 1.1 (39)	0.012 \pm 0.027 (39)	-0.012 \pm 0.086 (39)
El Pardo (EP)	658	40.50	18.49	263.9	-0.599	75.8 \pm 6.4 (6)	6.2 \pm 1.1 (5)	0.008 \pm 0.223 (5)	0.42 \pm 0.06 (25)	61.7 \pm 1.5 (25)	0.53 \pm 0.06 (25)	29.2 \pm 1.1 (25)	-0.010 \pm 0.027 (25)	0.035 \pm 0.063 (25)
Sotos de Sepúlveda (S)	1,042	41.32	14.11	397.0	1.379	78.4 \pm 4.4 (5)	6.3 \pm 0.5 (4)	-0.007 \pm 0.096 (4)	0.40 \pm 0.03 (17)	57.3 \pm 1.6 (17)	0.5 \pm 0.03 (17)	28.2 \pm 0.5 (17)	-0.038 \pm 0.017 (17)	0.051 \pm 0.060 (17)
Valdepeñas (V)	722	38.90	18.08	256.9	-0.723	73.0 \pm 4.3 (7)	4.3 \pm 0.6 (3)	-0.167 \pm 0.097 (3)	0.41 \pm 0.06 (8)	62.4 \pm 2.1 (8)	0.52 \pm 0.07 (8)	29.8 \pm 1.0 (8)	0.015 \pm 0.023 (8)	-0.036 \pm 0.118 (8)
Villuercas (VI)	960	39.46	16.60	325.3	0.243	77.0 \pm 4.8 (10)	5.9 \pm 2.2 (9)	-0.089 \pm 0.287 (9)	0.41 \pm 0.05 (42)	60.7 \pm 1.3 (42)	0.54 \pm 0.07 (42)	29.6 \pm 1.5 (42)	0.006 \pm 0.038 (42)	0.012 \pm 0.071 (42)

32°C between 10 and 16 h (Fig. 2). This was done to examine the effects of temperature variance on incubation period and phenotypic traits of hatchlings from different clutches, populations and lineages. When incubation was about to end, newborns were searched for daily, and the duration of incubation was noted. Hatchlings were weighed, measured (SVL), and individually toe-clipped. All lizards were released in their site of origin after all lab manipulation had finished.

Statistical Analyses

All variables measured (incubation time, egg mass, clutch size, SVL and body mass of females and hatchlings) were log-transformed to meet the requirements of parametric tests. Body condition of hatchlings was estimated using the residuals of the regression of log-body mass on log-SVL at hatching. Similarly, we calculated relative clutch size of females (i.e. clutch size adjusted for female SVL) using the residuals of the regression of log-clutch size on log-SVL.

Unless otherwise stated, data were analysed using general linear models. To partition variation in phenotypic traits among different sources of variation (i.e. lineage, population, and clutch), we employed nested analyses of variance. This procedure, which was the earliest statistical approach to interspecific comparative studies (Harvey and Mace 1982), was chosen here because more conventional methods such as independent contrasts (Felsenstein 1985) or phylogenetic autocorrelation (Cheverud et al. 1985) require that the units subject to analysis have a phylogenetic history that represents hierarchical descent, and this assumption may not hold when there is substantial gene flow between units, as it may be the case in intraspecific analyses. Moreover, our genetic data allowed us to obtain a phylogeny of mtDNA haplotypes (Verdú-Ricoy et al. 2010), but not of populations (which may contain several, more or less differentiated haplotypes). Thus, we employed nested ANOVA relying only on two assumptions: (1) there

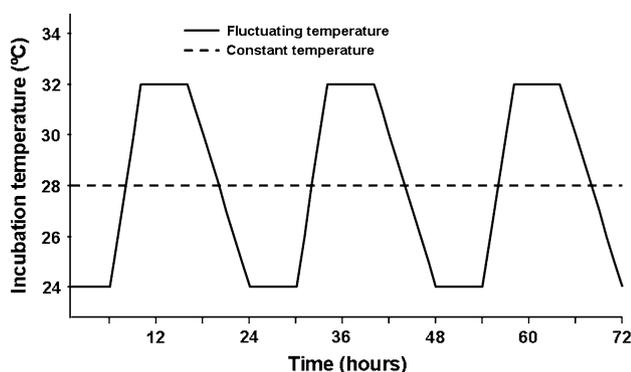


Fig. 2 Temperature as a function of time of day in the two incubation regimes used in this study according to a split-clutch design

was an ancient (ca. 3.6 My) split between eastern and western clades which have maintained their genetical identity since that time (Carranza et al. 2006; Verdú-Ricoy et al. 2010); and (2) gene flow is by definition more likely to occur within populations than among them.

To test for incubation temperature effects, we used within-subject analyses of variance. For each clutch, we compared the average value of hatchlings incubated at a constant temperature of 28°C, with that of hatchlings incubated under a fluctuating temperature regime. To avoid having too small sample sizes, we pooled data from both incubation treatments when analyzing clutch, population, and lineage effects on hatchling traits. This makes our analyses conservative, because the potential effects of constant versus cycling temperature are confounded in the error term. Geographical and meteorological variables were reduced to a single factor using Principal Component Analysis. No viable eggs were obtained from the only clutch laid by a female from Despeñaperros. As a consequence, this population was omitted in all analyses concerning reproductive variables. Similarly, we excluded Villuercas, the population with both kinds of mtDNA haplotypes, from all analyses using lineage as a classification factor.

Results

Nested ANOVAs (Table 2) with the data shown in Table 1 revealed significant variation among females, nested within populations, in all propagule traits examined (incubation time, egg mass, SVL at hatching, body condition—i.e., SVL-adjusted body mass—of hatchlings, and SVL at hatching adjusted for egg mass). There was also significant variation among populations, nested within mtDNA lineages, for all propagule traits with the exception of egg mass (for which the only important source of variation was among females of a given population). Similarly, female traits (SVL, clutch size and SVL-adjusted clutch size) differed significantly among populations of a given lineage. However, lineage effects were significant only for incubation time, explaining 45% of its total variance among sites (Table 2). Clutch size differences among populations were mainly, but not entirely, a result of differences in maternal body size (ANCOVA: population effect: $F_{12,53} = 1.99$, $P = 0.044$; maternal SVL: $F_{1,53} = 38.33$, $P < 0.001$; compare with population effect shown in Table 2).

Biogeographical analyses with population means as data points yielded several interesting results. All geographical and meteorological variables were combined into a single Principal Component (Table 3) that could be interpreted as a climatic gradient of productivity in the Mediterranean

Table 2 Hierarchical nested ANOVAs for propagule and female traits; for propagules, sources of variation are female nested within population, population nested within mtDNA lineage, and mtDNA lineage (eastern vs western); for females, sources of variation are population nested within lineage and lineage

	F	df	P	%var
<i>Egg mass</i>				
mtDNA lineage	0.85	1, 11	0.375	1.66
Population	1.52	11, 54	0.151	21.39
Female	42.78	54, 263	<0.001	69.08
<i>Incubation time</i>				
mtDNA lineage	14.09	1, 11	0.003	45.37
Population	24.62	11, 54	<0.001	35.43
Female	2.84	54, 263	<0.001	7.06
<i>SVL at hatching</i>				
mtDNA lineage	0.58	1, 11	0.462	2.41
Population	8.19	11, 54	<0.001	45.67
Female	5.44	54, 263	<0.001	27.39
<i>Residuals of hatchling SVL on egg mass</i>				
mtDNA lineage	0.26	1, 11	0.623	1.05
Population	11.33	11, 54	<0.001	45.32
Female	2.81	54, 263	<0.001	19.63
<i>Residuals of hatchling mass on hatchling SVL</i>				
mtDNA lineage	1.94	1, 11	0.191	3.19
Population	2.11	11, 54	0.035	18.05
Female	5.55	54, 263	<0.001	41.94
<i>SVL female</i>				
mtDNA lineage	3.07	1, 11	0.108	11.71
Population	4.45	11, 54	<0.001	41.97
<i>Clutch size</i>				
mtDNA lineage	0.87	1, 11	0.371	3.91
Population	5.19	11, 54	<0.001	49.4
<i>Relative fecundity (residuals of log-clutch size on log-maternal SVL)</i>				
mtDNA lineage	0.31	1, 11	0.589	0.91
Population	2.39	11, 54	0.017	32.44

Table 3 Principal component analysis with climatic variables shown in Table 1, showing factor loadings (all P 's < 0.003), eigenvalue and percentage of explained variance for the first component obtained

	PC1
Latitude	0.712
Altitude	0.819
Temperature	-0.937
Precipitation	0.807
Eigenvalue	2.707
Expl.Var	0.677

region, giving higher scores to localities at higher latitude or elevation, with higher precipitation levels and lower temperature during the lizards' activity season. These scores were negatively correlated with the residuals of SVL at hatching on egg mass ($r = -0.639$, $n = 14$, $P = 0.014$), meaning that for a given egg size newborns were larger at warmer and drier sites. The body size of females was larger at cooler, more humid, and presumably more productive sites (correlation between factor scores and mean SVL of females: $r = 0.566$, $n = 15$, $P = 0.028$). On average,

eastern lineage localities were drier than western ones (mean \pm SD for precipitation levels between March and October; eastern lineage: 264.8 ± 55.2 mm; western lineage: 356.3 ± 102.2 mm; $F_{1,12} = 4.88$, $P = 0.047$), and western lineage females were somewhat larger than eastern ones (eastern lineage: 74.0 ± 5.1 mm; western lineage: 79.0 ± 2.4 mm; $F_{1,12} = 4.11$, $P = 0.065$). As it could be expected, clutch sizes were larger for those populations with larger females (correlation between mean clutch size and maternal SVL: $r = 0.792$, $n = 14$, $P = 0.001$), and the clutch size-propagule size trade-off was evident at the population level: egg mass, hatchling mass and SVL at hatching were negatively correlated with the residuals of mean clutch size on mean maternal SVL (all r 's < -0.6 and all P 's ≤ 0.02). Finally, incubation time (Fig. 3) was the reproductive trait that was best predicted by a combination of historical (mtDNA lineage) and ecological factors (PC1). Within each lineage, the duration of incubation decreased as PC1 increased (i.e. incubation was shorter at cooler and more productive sites; ANCOVA:

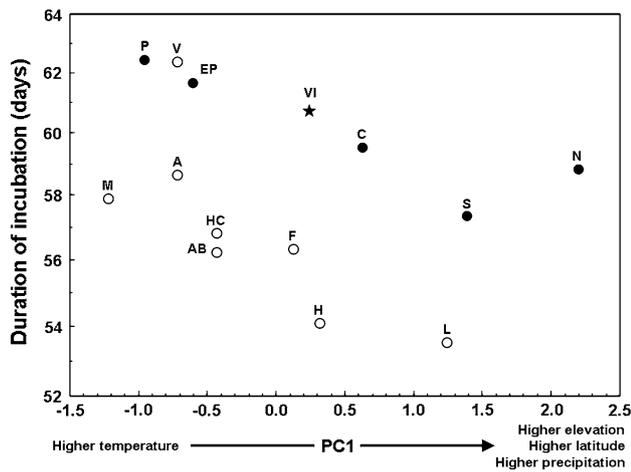


Fig. 3 Duration of incubation as a function of (1) a climatic gradient giving higher scores to sites with lower temperature and higher precipitation, elevation and/or latitude (see Table 1); and (2) mtDNA lineage. See Fig. 1 for symbols of populations and lineages

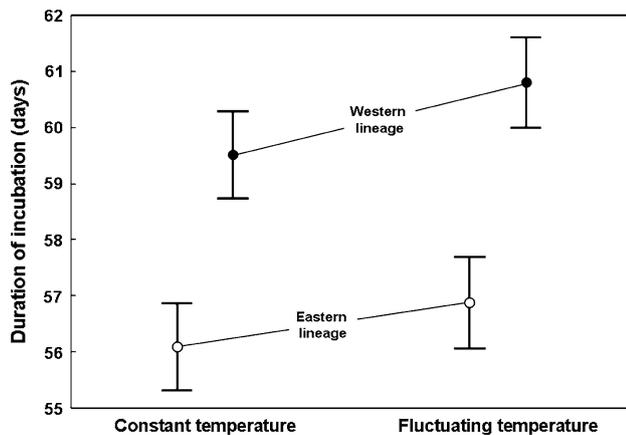


Fig. 4 Duration of incubation (mean \pm 95% confidence interval) as a function of incubation regime (fixed vs. cycling regime) and mtDNA lineage

$F_{1,10} = 12.27$, $P = 0.0057$), and for a given climate it was shorter for eastern than for western lineage populations (ANCOVA: $F_{1,10} = 15.91$, $P = 0.0026$; see Fig. 3). Together, these two variables explained 67.3% of the variance in average incubation times ($F_{2,10} = 10.3$, $P = 0.004$).

Incubation regime had no effect on hatchling SVL, mass, or condition (all $P > 0.14$), but it did affect incubation time. Within each clutch, the duration of incubation was shorter under a fixed temperature regime than under a cycling temperature regime (within-subjects ANOVA with the data shown in Fig. 4: $F_{1,65} = 62.06$, $P < 0.001$), and such difference was slightly larger, pooling together all data from a given lineage, for western than for eastern clutches (regime \times lineage interaction: $F_{1,65} = 4.84$, $P = 0.031$).

Discussion

Our data show substantial intraspecific variation in all reproductive traits examined (female size, clutch size, relative fecundity, mean egg mass, SVL at hatching, body condition of hatchlings, and incubation time) on all the hierarchical levels considered. Here, we discuss the implications of our results for the hypotheses presented in the Introduction, with special reference to the relative importance of lineage, population and clutch as sources of variation for life-history traits, and within the context of some of the selective pressures that are characteristic of Mediterranean environments.

Concerning our first hypothesis, inter-population differences, which have been previously documented for reproductive traits in lacertids (Du et al. 2005; Iraeta et al. 2006; Díaz et al. 2007; Wang et al. 2011) and other families of lizards (Sears and Angilletta 2003; Radder 2006; Du et al. 2010a), were the main source of variation for clutch size and relative fecundity. Remarkably, inter-population differences were also important for female SVL, which had 54% of its variance explained by population effects; of this figure, ca. 12% was attributable to differences between eastern and western lineages, whereas the remaining 42% was associated with differences among populations of a given lineage. This pattern of variation was most likely caused by environmental differences in productivity, because mean female size was positively correlated with population scores on a gradient of increasing precipitation and decreasing temperature, and western lineage populations had both larger females and higher precipitation levels than eastern ones. In tropidurine lizards, a recent interspecific study has shown that female body size relates to a climatic component of precipitation which is likely a correlate of primary production; since clutch size depends on female size, productivity seems to exert an indirect effect on clutch size (Brandt and Navas 2011). Similarly, our data show that mean clutch size was mainly, but not entirely, dependent on female SVL, suggesting both a proximate effect of local conditions influencing maternal SVL, and a less important role of intrinsic, perhaps genetic differences among populations. A previous transplant experiment (Iraeta et al. 2006) between two populations of the western lineage included in this study (El Pardo and Navacerrada) proved that size and growth rate of juveniles were influenced by their mother's site of origin, which means that population differences may reflect a genetic differentiation (Du et al. 2005; Iraeta et al. 2006; Buckley et al. 2010). However, these traits were primarily determined by the growing environment, given that the high-elevation site (which produced slower-growing phenotypes) provided more food and allowed hatchlings to grow faster and reach larger size (Iraeta et al. 2006). If

these effects persist over time, they can generate maternal SVL and clutch size differences among populations like those reported in our study (but see Buckley et al. 2007).

Hatchling size, which differed significantly among populations and females but not between lineages (Table 2), was larger in drier and warmer sites, thus confirming our second hypothesis. Previous studies with this and other lizard species have found a similar pattern of larger hatchlings at warmer, drier, and lower latitude or elevation sites (Sinervo 1990; Iraeta et al. 2006; Díaz et al. 2007). However, the opposite pattern of larger hatchlings at higher latitude or elevation has also been reported (Oufiero and Angilletta 2006; Niewiarowski and Angilletta 2008; Du et al. 2010a, b), indicating an advantage of larger offspring in colder environments due to thermally imposed constraints on opportunities to find, ingest, and assimilate food (Adolph and Porter 1996; Sears and Angilletta 2003). Nevertheless, our data suggest an alternative interpretation that may be important to understand lizard life-histories in Mediterranean environments, where low summer precipitation and associated food scarcity can select for low activity levels, constrain the growth rates of juveniles, and thus increase the survival advantage of large hatchlings under conditions of food shortage and/or in drought years (Ferguson and Fox 1984; Sinervo and DeNardo 1996; Sears and Angilletta 2003; Iraeta et al. 2006, 2008). This is consistent with the hypothesis that the production of relatively larger offspring is an adaptive response to low food availability (Lack 1954) or, more generally, that a shift towards larger propagules will improve parental fitness in environments where conditions for juvenile growth and/or survival are poor (Roff 1992; Johnston and Leggett 2002). Such pattern may have two explanations, both of which are coherent with our data. The first one is population differentiation, with genetic differences favoring larger offspring in poor habitats, and the second one is an adaptive plastic response by the females, either directly or through maternal effects (Bernardo 1996; Johnston and Leggett 2002).

On the other hand, our second hypothesis failed to predict that egg mass and hatchlings' body condition (i.e. body mass adjusted for SVL) were the only propagule traits for which population effects were non significant or very small. Instead, these traits were mainly affected by differences among clutches of a given population (i.e. familial effects), perhaps due to the interacting effects of female size, clutch size, and relatedness between siblings. Whatever its causes, the very large amount of variance among clutches (relative to error variance) led familial effects to take priority over the remaining sources of variation for these traits.

Regarding our third hypothesis, we only obtained partial support for it, because the correlation between incubation time and ambient temperature was highly significant only after controlling for lineage effects. In fact, incubation time

was the only reproductive characteristic for which all sources of variation were important, including the divergence between eastern and western lineages (Table 2: ca. 45% of the total variance accounted for). Thus, our data show that the effect of the difference between these ancient lineages, that diverged before the opening of the Strait of Gibraltar (Carranza et al. 2006), prevails over the hierarchically lower population and female effects (35 and 7% of explained variance, respectively). Within each lineage, inter-population differences were mainly related to climatic influences, because at identical temperatures in the laboratory, incubation periods were shorter for lizards from cooler and wetter sites. Thus, the observed pattern reveals countergradient variation, because in the laboratory incubation periods increase as temperature of incubation decreases (Iraeta et al. 2006, 2007). Similar results have previously been reported for western fence lizards *Sceloporus undulatus* from populations that occur at different latitudes or altitudes, and therefore experience different environmental temperatures (Oufiero and Angilletta 2006; Niewiarowski and Angilletta 2008; Du et al. 2010a). However, it is important to note that countergradient variation is revealed by our data only after controlling for lineage effects, which strongly suggests that it has evolved independently in the two lineages. If such parallel patterns of population response have a genetic basis, they may have been shaped by selective pressures favouring shorter incubation to compensate for relatively slower embryonic growth in cooler environments (Oufiero and Angilletta 2006); in addition, higher food availability would promote more rapid post-natal growth in such environments, and this could outweigh the costs of hatching earlier and/or with a smaller size (Iraeta et al. 2006). The reason why eastern eggs hatch earlier than western ones remains unknown, although it might be related to differences in the availability of water for developing offspring, given that precipitation was the only environmental variable that differed significantly between western (more humid) and eastern (drier) sites. We are currently undertaking new incubation experiments to test this hypothesis.

Finally, it is worth mentioning that eggs incubated at a constant temperature of 28°C hatched earlier than did their siblings incubated at a fluctuating temperature of $28 \pm 4^\circ\text{C}$, particularly in the case of clutches from western population females (Fig. 4). This is surprising because previous studies have shown that for a given thermal mean incubation shortens as variance increases in the montane scincid lizard *Bassiana duperreyi* (Shine and Harlow 1996; Du and Shine 2010). These authors argue that in their study species there is an exponential relationship between developmental rate and temperature, which implies that a given thermal increase has more effect on development than does the same magnitude of thermal decrease.

Although we have no data, we can speculate that the opposite pattern may occur in *P. algirus*, a Mediterranean species in which females select oviposition sites with a mean temperature $\geq 26.0^{\circ}\text{C}$ and with a lower variance than available at random (Iraeta et al. 2007). Thus, if developmental rate increases at a lower speed above average incubation temperature than it does decrease below it, then the net effect of increasing thermal variance will be to hamper development. We encourage efforts to determine the thermal dependence of embryogenesis (yolk absorption, metabolic rate, heartbeat rate, etc.; Storm and Angilletta 2007; Oufiero and Angilletta 2010; Du and Shine 2010) under constant and fluctuating incubation temperatures in this and other species of lizards from warm and dry Mediterranean climates.

Acknowledgments This study is a contribution to projects CGL2007-60277/BOS and CGL2010-17928/BOS, funded by the Spanish Ministry of Education and Science. P.I. was funded by a PhD studentship from the Universidad Complutense de Madrid and J. V.-R. by a CSIC-JAE predoctoral grant. Permissions to capture lizards were provided by the Environmental Agencies from the Junta de Andalucía, Gobierno de Aragón, Junta de Castilla-La Mancha, Junta de Castilla-León, Junta de Extremadura, Comunidad de Madrid, and Gobierno de Murcia.

References

- Adolph, S. C., & Porter, W. P. (1993). Temperature, activity, and lizard life histories. *American Naturalist*, *142*, 273–295.
- Adolph, S. C., & Porter, W. P. (1996). Growth, seasonality, and lizard life histories: Age and size at maturity. *Oikos*, *77*, 257–278.
- Arnold, E. N. (1987). Resource partition among lacertid lizards in southern Europe. *Journal of Zoology. Series B*, *1*, 739–782.
- Avise, J. C. (1989). Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, *43*, 1192–1208.
- Ballinger, R. E. (1983). Life-history variations. In R. B. Huey, E. R. Pianka, & T. W. Schoener (Eds.), *Lizard ecology: Studies of a model organism* (pp. 241–260). Cambridge: Harvard University Press.
- Bauwens, D., & Díaz-Uriarte, R. (1997). Covariation of life-history traits in lacertid lizards: A comparative study. *American Naturalist*, *149*, 91–111.
- Bernardo, J. (1996). The particular maternal effect of propagule size, especially egg size: Patterns, models, quality of evidence and interpretations. *American Zoologist*, *36*, 216–236.
- Brandt, R., & Navas, C. A. (2011). Life-history evolution on tropidurinae lizards: Influence of lineage, body size and climate. *PLoS One*, *6*, e20040.
- Buckley, C. R., Irschick, D. J., & Adolph, S. C. (2010). The contributions of evolutionary divergence and phenotypic plasticity to geographic variation in the western fence lizard, *Sceloporus occidentalis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, *99*, 84–98.
- Buckley, C. R., Jackson, M., Youssef, M., Irschick, D. J., & Adolph, S. C. (2007). Testing the persistence of phenotypic plasticity after incubation in the western fence lizard, *Sceloporus occidentalis*. *Evolutionary Ecology Research*, *9*, 169–183.
- Carranza, S., Harris, D. J., Arnold, E. N., Batista, V., & González de la Vega, J. P. (2006). Phylogeography of the lacertid lizard, *Psammodromus algirus*, in Iberia and across the Strait of Gibraltar. *Journal of Biogeography*, *33*, 1279–1288.
- Cheverud, J. M., Dow, M. M., & Leutenegger, W. (1985). The quantitative assessment of phylogenetic constraints in comparative analyses—sexual dimorphism in body-weight among primates. *Evolution*, *39*, 1335–1351.
- Díaz, J. A., & Cabezas-Díaz, S. (2004). Seasonal variation in the contributions of different behavioural mechanisms to lizard thermoregulation. *Functional Ecology*, *18*, 867–875.
- Díaz, J. A., & Carrascal, L. M. (1991). Regional distribution of a Mediterranean lizard: Influence of habitat cues and prey abundance. *Journal of Biogeography*, *18*, 291–297.
- Díaz, J. A., Pérez-Tris, J., Bauwens, D., Pérez-Aranda, D., Carbonell, R., Santos, T., et al. (2007). Reproductive performance of a lacertid lizard at the core and the periphery of the species' range. *Biological Journal of the Linnean Society*, *92*, 87–96.
- Díaz, J. A., Pérez-Tris, J., Tellería, J. L., Carbonell, R., & Santos, T. (2005). Reproductive investment of a lacertid lizard in fragmented habitat. *Conservation Biology*, *19*, 1578–1585.
- Du, W. G., Ji, X. A., Zhang, Y. P., Lin, Z. H., & Xu, X. F. (2010a). Geographic variation in offspring size of a widespread lizard (*Takydromus septentrionalis*): Importance of maternal investment. *Biological Journal of the Linnean Society*, *101*, 59–67.
- Du, W. G., Ji, X., Zhang, Y. P., Xu, X. F., & Shine, R. (2005). Identifying sources of variation in reproductive and life-history traits among five populations of a Chinese lizard (*Takydromus septentrionalis*, Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, *85*, 443–453.
- Du, W. G., & Shine, R. (2010). Why do the eggs of lizards (*Bassiana duperreyi*: Scincidae) hatch sooner if incubates at fluctuating rather than constant temperatures? *Biological Journal of the Linnean Society*, *101*, 642–650.
- Du, W. G., Warner, D. A., Langkilde, T., Robbins, T., & Shine, R. (2010b). The physiological basis of geographic variation in rates of embryonic development within a widespread lizard species. *American Naturalist*, *176*, 522–528.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, *125*, 1–15.
- Ferguson, G. W., & Fox, S. F. (1984). Annual variation of survival advantage of large juvenile side-blotched lizards, *Uta stansburiana*—its causes and evolutionary significance. *Evolution*, *38*, 342–349.
- Ferguson, G. W., & Talent, L. G. (1993). Life-history traits of the lizard *Sceloporus undulatus* from two populations raised in a common laboratory environment. *Oecologia*, *93*, 88–94.
- Forsman, A., & Shine, R. (1995). Parallel geographic variation in body shape and reproductive life history within the Australian scincid lizard *Lampropholis delicata*. *Functional Ecology*, *9*, 818–828.
- Harvey, P. H., & Mace, G. M. (1982). Comparisons between taxa and adaptive trends: Problems of methodology. In King's College Sociobiology Group, et al. (Eds.), *Current problems in sociobiology* (pp. 343–362). Cambridge: Cambridge University Press.
- Harvey, P. H., & Pagel, M. D. (1991). *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Hewitt, G. M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, *68*, 87–112.
- Iraeta, P., Díaz, J. A., & Bauwens, D. (2007). Nest-site selection by *Psammodromus algirus* in a laboratory thermal gradient. *Journal of Herpetology*, *41*, 360–364.
- Iraeta, P., Monasterio, C., Salvador, A., & Díaz, J. A. (2006). Mediterranean hatchling lizards grow faster at higher altitude: A reciprocal transplant experiment. *Functional Ecology*, *20*, 865–872.

- Iraeta, P., Salvador, A., & Díaz, J. A. (2008). A reciprocal transplant study of activity, body size, and winter survivorship in juvenile lizards from two sites at different altitude. *Ecoscience*, *15*, 298–304.
- Johnston, T. A., & Leggett, W. C. (2002). Maternal and environmental gradients in the egg size of an iteroparous fish. *Ecology*, *83*, 1777–1791.
- Lack, D. (1954). *The natural regulation of animal numbers*. Oxford: Oxford University Press.
- Lessa, E. P., Cook, J. A., & Patton, J. L. (2003). Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 10331–10334.
- Lorenzon, P., Clobert, J., & Massot, M. (2001). The contribution of phenotypic plasticity to adaptation in *Lacerta vivipara*. *Evolution*, *55*, 392–404.
- Milá, B., Girman, D., Kimura, M., & Smith, T. (2000). Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North American songbird. *Proceedings of the Royal Society, London, Series B*, *267*, 1033–1040.
- Miles, D. B., & Dunham, A. E. (1992). Comparative analyses of phylogenetic effects in the life-history patterns of iguanid reptiles. *American Naturalist*, *139*, 848–869.
- Niewiarowski, P. H., & Angilletta, M. J. (2008). Countergradient variation in embryonic growth and development: Do embryonic and juvenile performances trade off? *Functional Ecology*, *22*, 895–901.
- Niewiarowski, P. H., Angilletta, M. J., & Leaché, A. D. (2004). Phylogenetic comparative analysis of life-history variation among populations of the lizard *Sceloporus undulatus*: An example and prognosis. *Evolution*, *58*, 619–633.
- Oufiero, C. E., & Angilletta, M. J. (2006). Convergent evolution of growth and development in lizard embryos. *Evolution*, *60*, 1066–1075.
- Oufiero, C. E., & Angilletta, M. J. (2010). Energetics of lizard embryos at fluctuating temperatures. *Physiological and Biochemical Zoology*, *83*, 869–876.
- Qualls, F. J., & Shine, R. (2000). Post-hatching environment contributes greatly to phenotypic variation between two populations of the Australian garden skink, *Lampropholis guichenoti*. *Biological Journal of the Linnean Society*, *71*, 315–341.
- Radder, R. S. (2006). An overview of geographic variation in the life history traits of the tropical agamid lizard, *Calotes versicolor*. *Current Science*, *91*, 1354–1363.
- Roff, D. A. (1992). *The evolution of life histories. Theory and analysis*. New York: Chapman & Hall.
- Sears, M. W., & Angilletta, M. J. (2003). Life-history variation in the sagebrush lizard: Phenotypic plasticity or local adaptation? *Ecology*, *84*, 1624–1634.
- Shine, R. (1983). Reptilian viviparity in cold climates: Testing the assumptions of an evolutionary hypothesis. *Oecologia*, *57*, 397–405.
- Shine, R. (2005). Life-history evolution in reptiles. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *36*, 23–46.
- Shine, R., & Harlow, P. S. (1996). Maternal manipulation of offspring phenotypes via nest-site selection in an oviparous lizard. *Ecology*, *77*, 1808–1817.
- Siliceo, I., & Díaz, J. A. (2010). A comparative study of clutch size, range size, and the conservation status of island vs. mainland lacertid lizards. *Biological Conservation*, *143*, 2601–2608.
- Sinervo, B. (1990). The evolution of maternal investment in lizards: An experimental and comparative analysis of egg size and its effects on offspring performance. *Evolution*, *44*, 279–294.
- Sinervo, B., & Adolph, S. C. (1989). Thermal sensitivity of growth rate in hatchling *Sceloporus* lizards: Environmental, behavioural and genetic aspects. *Oecologia*, *78*, 411–419.
- Sinervo, B., & DeNardo, D. F. (1996). Costs of reproduction in the wild: Path analysis of natural selection and experimental tests of causation. *Evolution*, *50*, 1299–1313.
- Sinervo, B., & Licht, P. (1991). Proximate constraints on the evolution of egg size, number, and total clutch mass in lizards. *Science*, *252*, 1300–1302.
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford: Oxford University Press.
- Storm, M. A., & Angilletta, M. J. (2007). Rapid assimilation of yolk enhances growth and development of lizard embryos from a cold environment. *Journal of Experimental Biology*, *210*, 3415–3421.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., & Cossons, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, *7*, 453–464.
- Telemeco, R. S., Radder, R. S., Baird, T. A., & Shine, R. (2010). Thermal effects on reptile reproduction: Adaptation and phenotypic plasticity in a montane lizard. *Biological Journal of the Linnean Society*, *100*, 642–655.
- Tracy, C. R., Packard, G. C., & Packard, M. J. (1978). Water relations in chelonian eggs. *Physiological Zoology*, *51*, 378–387.
- Veiga, J. P., & Salvador, A. (2001). Individual consistency in emergence data, a trait affecting mating success in the lizard *Psammmodromus algirus*. *Herpetologica*, *57*, 99–104.
- Verdú-Ricoy, J., Carranza, S., Salvador, A., Busack, S. D., & Díaz, J. A. (2010). Phylogeography of *Psammmodromus algirus* (Lacertidae) revisited: Systematic implications. *Amphibia-Reptilia*, *31*, 576–582.
- Wang, Z., Xia, Y., & Ji, X. (2011). Clutch frequency affects the offspring size-number trade-off in lizards. *PLoS One*, *6*, 1–5.
- Warner, D. A., & Shine, R. (2007). Fitness of juvenile lizards depends on seasonal timing of hatching, not offspring body size. *Oecologia*, *154*, 65–73.