

# Caracterización de las poblaciones de *Iberolacerta monticola* en el Noroeste ibérico mediante la combinación de datos morfológicos, ecológicos y genéticos

Morphological, ecological and genetic characterization of the NW Iberian populations of the lizard *Iberolacerta monticola*

PEDRO GALÁN<sup>1\*</sup>, MARTA VILA<sup>2</sup>, NURIA REMÓN<sup>2</sup> & HORACIO F. NAVEIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología, Facultad de Ciencias. Campus da Zapateira. Universidade da Coruña, España.

<sup>2</sup> Dpto. Biología Celular e Molecular, Facultad de Ciencias. Campus da Zapateira. Universidade da Coruña, España.

\*pgalan@udc.es

## RESUMEN

La lagartija cantábrica (*Iberolacerta monticola*) se ha extinguido o reducido sus poblaciones en varias localidades gallegas aisladas y de baja altitud en los últimos 30 años. Para evaluar su estado de conservación en el Noroeste de la península Ibérica, hemos obtenido datos ecológicos y morfológicos de individuos procedentes de once localidades de esta zona, analizando también su variabilidad genética, utilizando marcadores nucleares (microsatélites) y mitocondriales (470 pb de la región control). La población de O Pindo (A Coruña), aislada y a 100 km de la más próxima, muestra una inserción nucleotídica característica en su linaje mitocondrial y los mayores niveles de diferenciación en microsatélites, así como cierta diferenciación morfológica, posiblemente relacionada con el peculiar hábitat que ocupa en dichos montes.

**PALABRAS CLAVE:** Reptiles, *Iberolacerta monticola*, Galicia, Noroeste de España, poblaciones amenazadas, conservación, ADN mitocondrial, microsatélites, diferenciación interpoblacional.

## ABSTRACT

The Iberian rock lizard (*Iberolacerta monticola*) has gone extinct or severely declined in several low-altitude and isolated populations in Galicia during the last three decades. In order to assess the conservation status of this species in NW Iberia, we recorded morpho- and ecological data of individuals from eleven localities of this area. In addition, the genetic variability of these specimens was screened by combining nuclear (microsatellite) and mitochondrial markers (470 bp from the control region). The population established at O Pindo (A Coruña), at least 100 km apart from other populations, shows a conspicuous diagnostic difference in its mitochondrial lineage and the largest differentiation at microsatellite loci, as well as some morphological differentiation most likely linked to the particular habitat of this site, a relatively arid and rocky environment.

**KEY WORDS:** Reptiles, *Iberolacerta monticola*, Galicia, NW Spain, threatened populations, conservation, mitochondrial DNA, microsatellites, interpopulation differentiation.

## LABURPENA

Azken 30 urteetan, Sugandila kantabriarra (*Iberolacerta monticola*) galdu egin da edo populazioak nabarmen murriztu dira Galiziako hainbat udalerrri bakartutan eta garaiera gutxikotan. Haren kontserbazio-egoera ebaluatzeko, datu ekologiko eta biologikoak bildu ditugu eta markagailu nuklearretan dagoen bariabilitate genetikoak (mikrosateliteak) eta kontrol mitokondrial aldeak ere aztertu ditugu hamaika udalerritan. Montes do Pindoko populazioak (A Coruña), bakarturik eta hurbilenetik 100 km-ra, ezberdintasun berezi bat erakusten du mitokondriaren ikuspegitik, baita ezberdintasun morfologiko jakin bat ere, ziur aski aipatutako mendietan dagoen habitatari lotuta.

**GAKO-HITZAK:** Narrastiak, *Iberolacerta monticola*, Galizia, Espainia Iparralde, populazio mehatxatuak, kontserbazioa, ADN mitokondrial, mikrosateliteak, populazioen arteko ezberdintasuna.

## INTRODUCCIÓN

La lagartija cantábrica (*Iberolacerta monticola*) es un endemismo ibérico limitado a la Cordillera Cantábrica, Galicia y Serra da Estrela en Portugal. En la mayor parte de su área de distribución se encuentra ligada a zonas elevadas de montaña, al igual que sucede con el resto de las especies del género *Iberolacerta* (ARRIBAS, 1996; CARRANZA *et al.*, 2004; CROCHET *et al.*, 2004). Recientemente se ha descrito una nueva especie, *I. galani*, endémica de los Montes de León, a la cual estarían asignadas las poblaciones de Zamora, la Cabrera leonesa y Trevinca en Orense, anteriormente asignadas a *I. monticola* (ARRIBAS *et al.*,

2006). Esta nueva especie también se encuentra restringida a zonas elevadas de montaña. Sin embargo, en el norte de Galicia existen poblaciones que habitan en zonas de baja altitud, incluso al borde del mar (GALÁN, 1982, 1999a).

*Iberolacerta monticola* posee poblaciones relativamente numerosas y con bajo grado de aislamiento a lo largo de la Cordillera Cantábrica (PÉREZ-MELLADO, 2002). Sin embargo, otras poblaciones se encuentran aisladas y formadas por un número reducido de individuos, tanto en áreas montañosas de la provincia de Ourense (Macizo Central Ourenseño), como en comarcas de baja altitud de la provincia de A Coruña y norte de Lugo. Estas últimas ocupan zonas con

características ambientales muy determinadas, como fragmentos de bosques atlánticos en gargantas fluviales umbrías o cimas de montes rocosos en microhábitats húmedos y frescos por los vientos marinos (GALÁN, 1982, GALÁN & FERNÁNDEZ, 1993). En algunas de estas poblaciones se han podido comprobar en las últimas décadas declives poblacionales e incluso extinciones locales (GALÁN, 1999a, 1999b, 2005). Todo ello ha hecho que sean catalogadas como "Vulnerables" en Galicia en el Decreto 88/2007 por el que se regula el Catálogo Gallego de Especies Amenazadas (XUNTA DE GALICIA, 2007).

La estructura genética y las relaciones filogenéticas de las diferentes poblaciones de *Iberolacerta monticola*, especialmente las aisladas en zonas de baja altitud de Galicia, se conoce sólo muy parcialmente (ALMEIDA *et al.*, 2002; MAYER & ARRIBAS, 2003; CARRANZA *et al.*, 2004; ARRIBAS *et al.*, 2006). Estos autores encontraron una insospechada similitud genética entre las poblaciones de Galicia y las de la Serra da Estrela portuguesa, en contraste con una diferenciación mucho mayor entre las poblaciones de Galicia y las de la Cordillera Cantábrica. Es, por lo tanto, del mayor interés el tratar de dilucidar el grado de parentesco y las relaciones filogenéticas entre estas poblaciones de la lagartija cantábrica, así como conocer su estado de conservación. En base a esto, los objetivos del presente trabajo son: (1). Presentar información sobre las características demográficas y ecológicas generales de las poblaciones noroccidentales de *Iberolacerta monticola* (tamaño de la población, densidad, área ocupada por ésta, etc.). (2). Caracterizar genéticamente estas poblaciones mediante análisis de marcadores microsatélites y de su ADN mitocondrial (región control) para detectar tanto su grado de diferenciación genética interpoblacional como su variabilidad genética intrapoblacional. (3). Presentar datos sobre las principales características morfológicas de estas poblaciones y su posible relación con las características ambientales de las áreas que ocupan, así como su grado de diferenciación interpoblacional. (4). Señalar las principales amenazas para su conservación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Características poblacionales y morfológicas

Se seleccionaron una serie de zonas de estudio en el Noroeste ibérico con presencia de esta especie (GALÁN, 1982; 1999a), donde se delimitaron parcelas de estudio (1.000-2.500 m<sup>2</sup>), que fueron visitadas entre 1 y 3 veces al mes durante los períodos de mayor actividad de la especie (abril-julio). En cada visita se registraron las características (clase de edad, sexo, etc.) de todos los individuos observados,

intentando su captura a mano o con lazo, para la toma de datos morfológicos y su marcaje individual (para su posterior reconocimiento en recapturas). Los individuos fueron liberados in situ, tras serles tomados una serie de datos biométricos y de folidosis, así como de obtener una muestra de tejido (5-10 milímetros finales de la cola) para su análisis genético. También se obtuvieron datos sobre las características generales de los hábitats que ocupaba cada población. Las sucesivas recapturas de los individuos marcados aportaron información sobre el tamaño de las poblaciones (método Jolly-Seber; SUTHERLAND, 1996) y las tasas de mortalidad que sufren.

### Análisis genético

El ADN fue extraído empleando un método de sales (ALJANABI & MARTINEZ, 1997) a partir de tejido caudal. Se amplificó mediante PCR un fragmento de ~470 pb de la Región Control mitocondrial en 59 individuos de *Iberolacerta monticola* y cinco de *I. galani*. Se han secuenciado 5 individuos de cada localidad muestreada (figura 3), menos en las localidades coruñesas de Pindo (n=10), Xistral (n=10) y Lambre (n=6). Las reacciones de amplificación se desarrollaron convencionalmente, utilizando los cebadores DL3F y DL4R (CROCHET *et al.*, 2004), y sus productos fueron secuenciados bidireccionalmente en un secuenciador automático ABI 3130xl.

Los haplotipos y sus frecuencias se identificaron mediante el software COLLAPSE 1.2. (<http://darwin.uvigo.es>). La relación entre los distintos haplotipos se infirió mediante una red de parsimonia estadística (TEMPLETON *et al.*, 1992) calculada con el programa TCS 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000). En el cálculo de la red se incluyeron tres secuencias ya publicadas por CROCHET *et al.* (2004): una de *I. monticola monticola* (Serra da Estrela, Portugal), con código de acceso en Genbank AY267247, y dos de *I. monticola cantabrica* (Ancares, Lugo), con códigos AY267248 y AY267249. Nótese que en el cálculo de esta red, las inserciones y deficiencias (*indels*) se han considerado como 5<sup>º</sup> carácter.

Asimismo, se han genotipado 139 individuos mediante nueve loci microsatélites, desarrollados para otras especies de lacértidos. Dichos marcadores son AF100290, AF100291, AF100293 (BOUDJEMADI *et al.*, 1999), AY147826 (NEMBRINI & OPPLIGER, 2003) y AY54520, AY54522, AY54526, AY54527, AY54528 (PINHO *et al.*, 2004). Las reacciones de amplificación mediante PCR se llevaron a cabo en condiciones convencionales. Los distintos alelos fueron separados y visualizados en un secuenciador automático ABI 3700, interpretándose el tamaño de los electroferogramas mediante el programa GeneMapper v3.7 (ABI).

Tanto los parámetros descriptivos (el número promedio de alelos por locus,  $K_s$ , heterocigosidad esperada,  $H_e$ ), como los estadísticos  $F$  (análisis del grado de diferenciación entre poblaciones,  $F_{ST}$ , y subdivisión intrapoblacional,  $F_{IS}$ ) se han calculado con el programa GENETIX 4.05 (BELKHIR, K., BORSA, P., CHIKHI, L., RAUFASTE, N. & BONHOMME, F. 2004. <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>).

## RESULTADOS

### Características morfológicas y ecológicas

Las características morfológicas de tres poblaciones aisladas (Pindo, Mandeo y Lambre) difieren poco entre sí (tabla I). En todas ellas los machos adultos de

más edad (>4-5 años) presentan una coloración verde intensa que ocupa toda o la mayor parte de la zona dorsal y flancos (figura 1 y 2). Se han comparado muestras de machos adultos de cada población, encontrando que los más diferenciados son los del Pindo, que difieren significativamente de los de las otras dos en la mayor altura proporcional de la cabeza (índices AC/LP y AC/LCC) y en la mayor frecuencia de aparición de una placa supernumeraria entre las placas supranasales. También difieren en el número de escamas dorsales y ventrales de los del Mandeo, aunque no de los del Lambre. Los machos de las poblaciones del Mandeo y Lambre únicamente difieren entre sí en el número de escamas dorsales.

	Pindo (P)		Mandeo (M)		Lambre (L)		ANOVA	P vs M	P vs L	M vs L
	Media±ES Rango	N	Media±ES Rango	N	Media±ES Rango	N				
LCC	69,8±1,44 58,3-75,4	11	65,9±1,00 54,0-70,1	17	68,3±1,60 54,0-75,5	15	2,18 (NS)	2,03 (NS)	0,29 (NS)	0,91 (NS)
LP	16,9±0,37 13,7-18,8	11	16,2±0,28 13,8-17,8	17	16,9±0,41 13,2-18,5	15	1,25 (NS)	0,77 (NS)	0,002 (NS)	1,01 (NS)
AP	8,4±0,24 7,0-9,6	11	8,2±0,17 6,5-9,1	17	8,4±0,25 6,0-9,6	15	0,39 (NS)	0,17 (NS)	0,02 (NS)	0,36 (NS)
AC	7,1±0,20 6,0-8,1	11	7,2±0,18 5,5-8,0	17	7,2±0,22 5,2-8,5	15	0,10 (NS)	0,05 (NS)	0,10 (NS)	0,01 (NS)
LMA	23,8±0,37 21,0-25,0	11	22,4±0,44 19,1-26,1	17	23,4±0,77 19,5-25,7	7	2,44 (NS)	2,24 (NS)	0,12 (NS)	0,86 (NS)
LMP	34,1±0,63 29,0-36,1	11	32,6±0,49 27,9-35,7	17	34,4±1,06 29,9-37,5	7	2,25 (NS)	1,48 (NS)	0,03 (NS)	1,54 (NS)
Peso	8,21±0,50 4,8-10,3	11	6,98±0,38 3,8-9,6	17	7,91±0,54 3,9-11,1	15	1,91 (NS)	1,59 (NS)	0,09 (NS)	1,09 (NS)
LP/LCC	0,24±0,01 0,23-0,25	11	0,25±0,01 0,23-0,26	17	0,25±0,01 0,24-0,26	15	2,69 (NS)	1,72 (NS)	2,46 (NS)	0,11 (NS)
AP/LCC	0,12±0,01 0,11-0,13	11	0,12±0,01 0,11-0,13	17	0,12±0,01 0,11-0,13	15	1,65 (NS)	1,57 (NS)	0,94 (NS)	0,08 (NS)
AC/LP	0,50±0,01 0,45-0,54	11	0,44±0,01 0,39-0,49	17	0,43±0,01 0,38-0,46	15	28,05 ***	17,21 ***	26,11 ***	1,43 (NS)
AC/LCC	0,12±0,01 0,11-0,12	11	0,11±0,01 0,10-0,12	17	0,11±0,01 0,10-0,12	15	15,09 ***	9,04 ***	14,15 ***	0,86 (NS)
LMA/LCC	0,34±0,01 0,32-0,37	11	0,34±0,01 0,30-0,37	17	0,33±0,01 0,31-0,36	7	0,81 (NS)	0,03 (NS)	0,72 (NS)	0,60 (NS)
LMP/LCC	0,49±0,01 0,47-0,53	11	0,50±0,01 0,47-0,53	17	0,49±0,01 0,44-0,51	7	0,64 (NS)	0,44 (NS)	0,01 (NS)	0,41 (NS)
Dorsalia	53,6±0,55 49 - 59	17	56,8±0,41 52 - 60	23	53,7±0,62 51 - 58	12	13,92 ***	10,90 ***	0,01 (NS)	8,22 ***
Ventralia	26,1± 0,25 24 - 27	15	25,1±0,24 23 - 27	41	25,8±0,22 25 - 27	9	4,11 *	3,85 *	0,23 (NS)	1,31 (NS)
Gularia	25,8±0,28 24 - 28	16	25,6±0,31 22 - 28	23	25,2±0,70 22 - 28	9	0,45 (NS)	0,13 (NS)	1,26 (NS)	1,19 (NS)
Femoralia	17,4±0,31 15,5-19,0	11	14,4±0,21 14,5-19,0	24	17,1±0,44 14,0-19,5	13	0,26 (NS)	0,01 (NS)	0,17 (NS)	0,23 (NS)
Supranu-meraria	1,33±0,14 1 - 2	12	0,67±0,01 0 - 2	39	0,64±0,11 0 - 1	22	8,45 ***	7,07 **	7,26 **	0,09 (NS)

**Tabla I.** Características morfológicas (biometría y foliodosis) de machos adultos de *Iberolacerta monticola* en tres poblaciones aisladas de A Coruña. Se indican los valores medios ± 1 error estándar (ES), el rango de variación y el tamaño de la muestra en cada caso (N). Se comparan los valores medios de las tres poblaciones mediante una ANOVA y el test a posteriori de Scheffé entre las poblaciones del Pindo (P), Mandeo (M) y Lambre (L), indicando el valor de F y el nivel de significación: \*\*\* : P < 0.001; \*\* : P < 0.01; \* : P < 0.05; (NS) : no significativo; P > 0.05. LCC: longitud de la cabeza más el cuerpo. LP: longitud del pileo. AP: anchura del pileo. AC: altura de la cabeza. LMA: longitud de la extremidad anterior. LMP: longitud de la extremidad posterior. Longitudes en mm y pesos en gr.

**Table I.** Morphological characteristics (biometric and scalation characters) and significant differences (ANOVA) among adult males from three isolated populations of *Iberolacerta monticola* from A Coruña (NW Spain). LCC: snout-vent length. LP: pileus length. AP: pileus width. AC: head depth. LMA: forelimb length. LMP: hindlimb length. Length in mm and weigh in gr.



**Figura 1.** Macho adulto (Nº 14, de doce años de edad en 2006) de la población del Lambre (Vilarmaior, A Coruña), muy reducida y restringida a los muros de un edificio. (Foto: Pedro Galán).

**Figure 1.** Adult male (No 14, which was twelve years old in 2006) from the population of Lambre (Vilarmaior, A Coruña). This population is very small and restricted to the walls of a building.



**Figura 2.** Macho adulto de la población de Montes do Pindo (Carnota, A Coruña), aislada en un monte rocoso costero. (Foto: Pedro Galán).

**Figure 2.** Adult male from the Montes do Pindo (Carnota, A Coruña) population, isolated in a coastal rocky mountain.

En la tabla II se indican las características generales del hábitat de las poblaciones estudiadas, así como sus densidades y estimas del número de individuos que las integran. Según éstas, se pueden agrupar las poblaciones de lagartija cantábrica en dos grupos: poblaciones de montaña (que viven por encima de los 800 m de altitud) y de baja altitud (por debajo de los 650 m). En las mon-

tañas se pueden diferenciar además entre la población de la sierra de Os Ancares (Lugo y León), que está en contacto con el resto de las poblaciones de la Cordillera Cantábrica, extendida sobre una superficie muy amplia, y la de Cabeza de Manzaneda (serra de Queixa, Ourense), aislada de las restantes de su especie y formada por un número relativamente reducido de individuos.

Población, Localidad	Altitud en metros (rango)	Área total ocupada por la población (ha)	Hábitat	Densidades medias (indiv/ha)	Tamaño estimado de la población (límites de confianza)
Cuenca del río Lambre. Güimil, Vilarmador (A Coruña)	35	0,25	Construcción humana en bosque de ribera (minicentral)	80	15 – 25
Cuenca del río Mandeo Paderne y Coirós (A Coruña)	30 – 90	265	Afloramientos rocosos en bosques de ribera	3 – 86	5.962 – 10.600
Montes del Pindo Carnota (A Coruña)	340 – 629	110	Roquedos con matorral	10 – 103	1.665 – 8.125
Sobrado dos Monxes (A Coruña)	511	15	Muros de piedra (monasterio)	90 – 120	720 – 1.530
Serra de Os Ancares (Lugo y León)	850 – 1.950	>10.000	Rocas y piedras en matorrales y bosques	52 – 150	>10.000
Cabeza Grande d Manzaneda (Ourense)	1.600 – 1.778	350	Roquedos y canchales en brezal montano	20 – 125	3.646 – 9.390

Tabla II. Datos poblacionales de *Iberolacerta monticola* de diversas zonas del Noroeste ibérico.

Table II. Population data of *Iberolacerta monticola* from several areas of the North-west of the Iberian peninsula

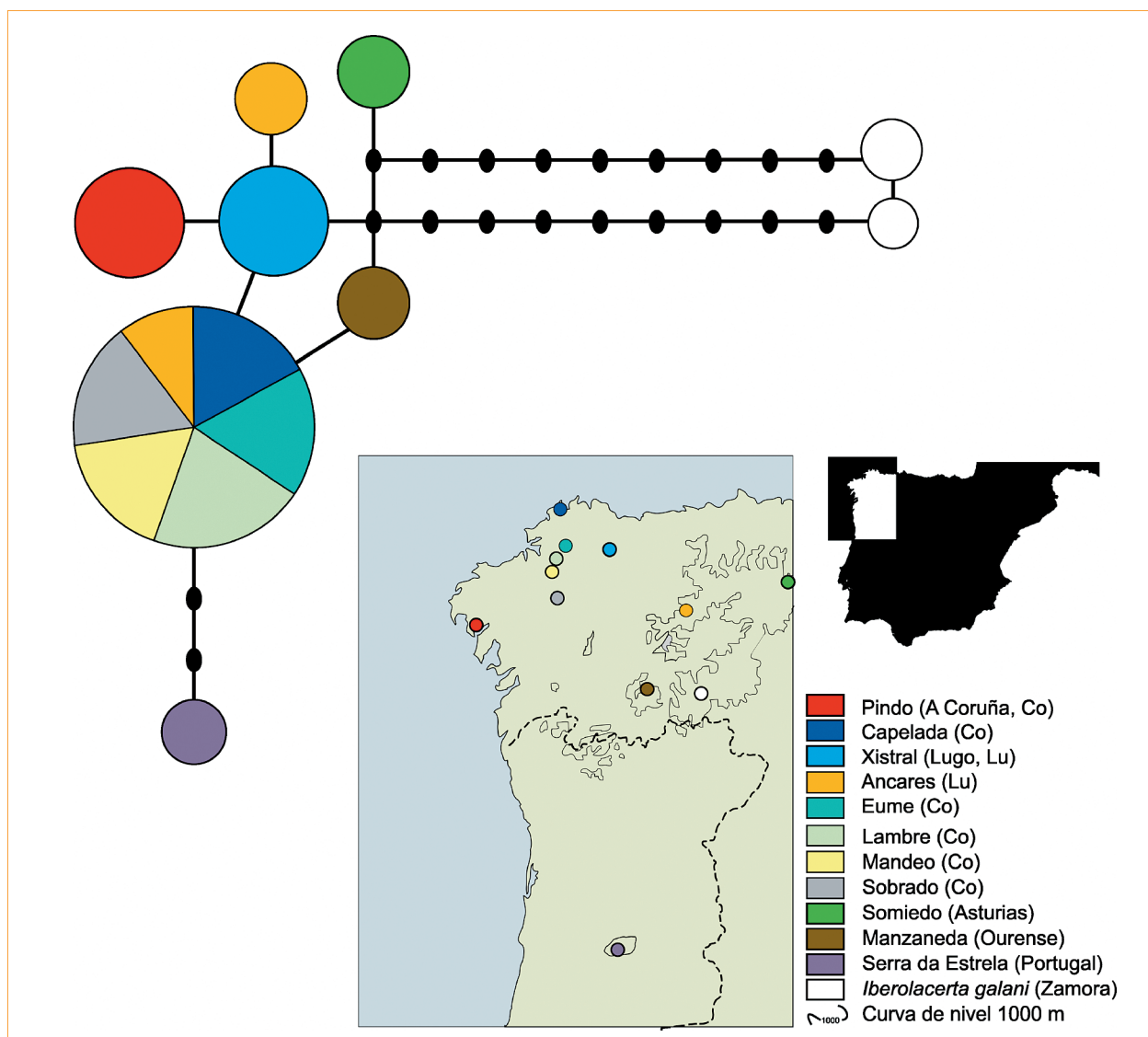
El grupo de poblaciones de baja altitud también es muy heterogéneo en las características ambientales del área ocupada, su superficie y el número de individuos que las integran. La población de Sobrado (A Coruña) difiere de las restantes por no ocupar un medio montañoso ni tampoco gargantas fluviales con bosques (como las de la periferia del golfo Ártabro). Vive actualmente restringida a los muros de piedra del monasterio de Sobrado dos Monxes y áreas próximas, en una zona altamente antropizada. La población del Pindo (A Coruña) se localiza en las zonas altas de este monte rocoso, ocupando microclimas húmedos que reciben los vientos húmedos del mar, en un medio dominado por los ambientes expuestos y secos. Por el contrario, las poblaciones de la periferia del Golfo Ártabro (ríos Lambre, Mandeo, Eume, etc.), viven en el fondo de valles fluviales cubiertos por bosques de ribera y robledales mixtos, utilizando sustratos rocosos o artificiales (construcciones humanas) en los claros del bosque. Por su tamaño poblacional, extremadamente reducido, destaca la población del río Lambre, restringida a los muros y áreas inmediatas de una central hidroeléctrica (en total, sólo 2.500 m<sup>2</sup>). Sin embargo, hace 25-30 años ocupaba otras zonas de la cuenca de este río y del vecino río Baxoi, siendo su población mucho mayor (figura 4).

### Características genéticas

Los 470 pb de las 64 secuencias de la región control de *Iberolacerta monticola* dieron lugar a siete haplotipos (*Genbank accession numbers* AY267247, AY267248, AY267249, EF121827, EF121829, EF121831 y EF121832). Los cinco individuos de *I. galani* presentaron dos haplotipos diferentes (EF121835- EF121836). Los siete haplotipos hallados en las secuencias de *I. monticola* se deben a 10 cambios nucleotídicos y 1 *indel*. La figura 3 muestra la red

de parsimonia relacionando estos haplotipos entre sí y con los de *I. monticola* de la Serra da Estrela (CROCHET *et al.*, 2004) y los de *I. galani*. Las poblaciones gallegas se diferencian claramente de la de Somiedo (Asturias), e incluso algunas de ellas entre sí, aunque la variación detectada es siempre escasa y de poco valor filogenético (la mayoría de los cambios afectan a una sola posición y son privados). Destaca un tanto en este sentido la población de El Pindo, que presenta una inserción de 10 pb compartida por todos los individuos analizados. Por otra parte, la coexistencia de dos linajes mitocondriales bien diferenciados (dos cambios nucleotídicos) en los Ancares refiere a episodios históricos de fragmentación y mezcla de poblaciones. Uno de esos dos linajes es el que se encuentra en todas las poblaciones de baja altitud de la periferia del Golfo Ártabro.

Los resultados del análisis de microsatélites se muestran en la tabla III. Aunque todos los loci son polimórficos en todas las poblaciones, el número promedio de alelos por locus ( $K_e$ ) varía considerablemente, obteniéndose los valores más bajos en las poblaciones de Sobrado, Manzaneda y Pindo (3,7-5,1), y los más altos en Ancares, Xistral y Mandeo (8,1-10,6). La misma agrupación, aunque con diferencias de rango dentro de cada grupo, se observa en términos de heterocigosis ( $H_e$ ), con el mínimo en Pindo (0,573) y el máximo en Ancares (0,842). La menor diferenciación genética interpoblacional ( $F_{ST}$ ) se obtiene en los valles del golfo Ártabro (promedio de 0,051 para Eume, Mandeo y Lambre), y la mayor en las comparaciones con la población de Pindo (0,150-0,322). Todos los valores de  $F_{IS}$  son positivos, como consecuencia de un defecto de heterocigotos, que va desde un mero 1,8% en Manzaneda hasta un 23,5% en Sobrado.



**Figura 3.** Red de parsimonia relacionando los haplotipos de la región control mitocondrial de *Iberolacerta monticola* e *I. galani*. Cada círculo coloreado representa un haplotipo diferente. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que lo portan. Cada color señala el origen geográfico del haplotipo. Cada segmento lineal conectando haplotipos representa un paso mutacional (*indel* o sustitución). Los círculos negros representan haplotipos "intermedios-no-muestreados".

**Figure 3.** Parsimony network showing the phylogeny of mitochondrial haplotypes obtained for *Iberolacerta monticola* and *I. galani* (root). Haplotypes were revealed by sequencing ~460 bp of the mitochondrial control region. Each circle represents a different haplotype. Circle size reflects the frequency of each haplotype (5-10 individuals sequenced per locality). Colors display the geographical localities where each haplotype is found. Solid lines connecting haplotypes represent a single mutation event, regardless of their length. Small black ovals represent missing or theoretical haplotypes.

	Ancares	Pindo	Mandeo	Xistral	Manzaneda	Sobrado	Eume	$K_e$	$H_e$	$F_{is}$
Lambre	0,081	0,153	0,051	0,129	0,198	0,220	0,059	5,6	0,723	0,173
Ancares		0,137	0,077	0,094	0,157	0,200	0,040	8,1	0,842	0,105
Pindo			0,168	0,229	0,241	0,322	0,150	5,1	0,573	0,147
Mandeo				0,125	0,125	0,166	0,051	10,6	0,766	0,193
Xistral					0,190	0,211	0,122	8,4	0,819	0,108
Manzaneda						0,255	0,143	4,0	0,594	0,018
Sobrado							0,143	3,7	0,585	0,235
Eume								7,0	0,760	0,063

**Tabla III.** Diversidad genética intrapoblacional ( $K_e$ ,  $H_e$  y  $F_{is}$ ) y diferenciación interpoblacional ( $F_{ST}$ , matriz diagonal superior) para marcadores nucleares en *Iberolacerta monticola* (4-9 loci microsatélites).  $K_e$  = número promedio de alelos por locus;  $H_e$  = heterocigosis esperada;  $F_{is}$ ,  $F_{ST}$  = índices de fijación de Wright.

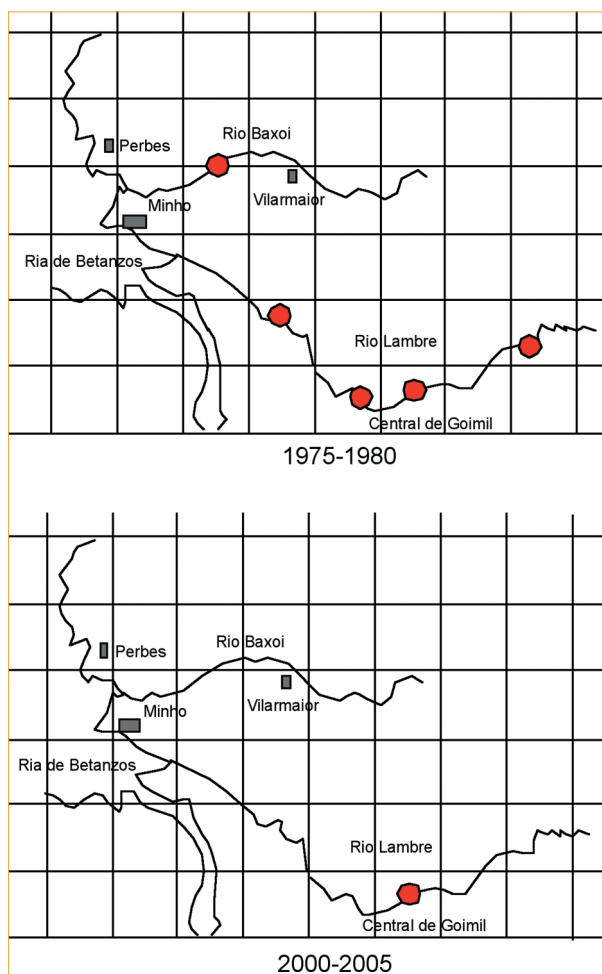
**Table III.** Intrapopulation genetic diversity ( $K_e$ ,  $H_e$  y  $F_{is}$ ) and pairwise interpopulation differentiation ( $F_{ST}$ , upper diagonal matrix) for nuclear markers in *Iberolacerta monticola* (4-9 microsatellite loci).  $K_e$  = average number of alleles per locus;  $H_e$  = expected heterozygosity;  $F_{is}$ ,  $F_{ST}$  = Wright's fixation statistics.

## DISCUSIÓN

La única población que ha mostrado diferencias morfológicas significativas con las restantes es la del Pindo. La mayor altura de la cabeza de los individuos de esta población podría estar relacionada con el tipo de hábitat y los refugios usados, ya que los lacértidos de cráneo alto suelen utilizar más el suelo y menos los refugios en fisuras (ARNOLD, 1987; VANHOYDONCK & VAN DAMME, 1999), como parece corresponder con las observaciones de su comportamiento en el Pindo y el tipo de medio utilizado en esta zona.

Teniendo en cuenta la vinculación de gran parte de las poblaciones noroccidentales de baja altitud de *I. monticola* a los bosques atlánticos (poblaciones de las cuencas de los ríos Lambre, Mandeo, Eume, Belelle, Castro, entre otras; GALÁN, 1982, 1999a), cabe plantearse el que su distribución geográfica fuera mucho más extensa en el pasado, durante la máxima expansión de estos bosques, en el Óptimo Climático del Holoceno (período Atlántico, 7.500 a 4.500 años BP). En ese momento gran parte de las poblaciones posiblemente estarían potencialmente en contacto. Posteriormente, el deterioro climático reduciría la extensión de los bosques (a lo que se uniría la deforestación antrópica), comenzando el aislamiento de las poblaciones y las extinciones locales. Las condiciones ambientales más desfavorables para la especie se alcanzarían en la Pequeña Edad del Hielo, (máxima durante los siglos XVII y XVIII), coincidente además con la mayor reducción de los bosques por causas humanas (RAMIL *et al.*, 2002; GUTIÁN RIVERA, 2002). En ese momento se alcanzaría la situación de aislamiento y reducción poblacional actual. Sin embargo, en los últimos años se han reducido aún más estas poblaciones aisladas por el incremento de la alteración humana del medio (incendios, talas, plantaciones de árboles alóctonos, urbanización, abandono de labores agrícolas y silvícolas tradicionales, etc.), que incluso ponen en riesgo su futura conservación (GALÁN, 1999a, 1999b). Resulta notable la rapidez con que se han reducido algunas de estas poblaciones, tanto en su rango geográfico como en el número de individuos. En el plazo de sólo 25-30 años, las poblaciones que existían en las cuencas de los ríos Lambre y Baxoi (cuatro y una, respectivamente) se han visto reducidas a una única población en la zona media del río Lambre, extinguiéndose la del río Baxoi (GALÁN, 1999b) (figura 4). Esta última población remanente del Lambre, que contaba con no menos de 25-50 adultos en el período 1998-2000, se encuentra en la actualidad (año 2006) al borde de la extinción, con una población posiblemente inferior a los 15 individuos. Asimismo, la población de Sobrado (A Coruña) se extendía en el pasado (década de 1980 y anteriores) a los vecinos montes de Bocelo, donde no han sido vueltas a localizar (GALÁN,

1982; BALADO *et al.*, 1995). La variación observada en los loci microsátélites es en general coincidente con el escenario demográfico que se ha descrito, pues señala a Sobrado, Manzaneda y Pindo como las poblaciones de menor tamaño efectivo, y a Ancares, Xistral y Mandeo como las de mayor. Una conspicua excepción la constituye la población de Lambre, que, pese a encontrarse al borde de la extinción, manifiesta unos valores de diversidad genética relativamente elevados, que pudieran obedecer a una sobredominancia transitoria, asociada a depresión endogámica, tras una brusca y reciente reducción del tamaño poblacional. El grado de subdivisión intrapoblacional ( $F_{IS}$ ), presumiblemente vinculado a la estrategia reproductiva de los individuos, no parece guardar relación con el tamaño poblacional efectivo, pues sus valores extremos se observan en dos poblaciones similares en este aspecto (Manzaneda y Sobrado).



**Figura 4.** La población de *I. monticola* de la cuenca del río Lambre se encuentra limitada en la actualidad a una única subpoblación, al borde de la extinción. Hace 25-30 años ocupaba otras zonas de la cuenca de este río, además de la del Baxoi, siendo su población mucho mayor.

**Figure 4.** The population of *I. monticola* from Lambre river basin is now restricted to a single subpopulation, which is threatened with extinction. Only 25-30 years ago the species was present not only in this basin, but also in others nearby, such as Baxoi. Population sizes were also larger in former times.

La red de parsimonia obtenida refleja la diferenciación de la población de *I. monticola* procedente de Somiedo (Asturias), aislada desde un tiempo suficiente como para haber completado su distribución de linajes (*lineage sorting*). El grado de diferenciación entre esta población asturiana y las gallegas es semejante al observado entre éstas y la antiguamente denominada *I. monticola monticola* (Serra da Estrela, Portugal) (CROCHET *et al.*, 2004 y presente trabajo). El aislamiento de las poblaciones gallegas es relativamente moderno, habida cuenta del escaso número de diferencias nucleotídicas acumuladas desde la separación del ancestro común más reciente. La inserción de 10 pb observada en El Pindo es digna de mención, pues hasta ahora la presencia de *indels* en la región control mitocondrial de este grupo de lacértidos sólo se había registrado a nivel interespecífico, y generalmente implicando sólo 1 ó 2 posiciones nucleotídicas. La única excepción en términos de longitud la constituye *I. horvathi* (AY267243 y AY267244), que presenta una inserción de 11 pb prácticamente en el mismo lugar que la observada en la *monticola* de El Pindo, aunque de origen independiente. Este hecho subraya la naturaleza inestable de esa región del genoma mitocondrial. La singularidad genética de esta población de El Pindo, patente también en las diferencias en loci microsatélites, unida a su diferenciación morfológica, le confiere el mayor interés en términos de conservación y la hace merecedora de una atención preferente.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por los Proyectos REN2003-02931 /GLO (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y PGIDIT03RFO10301PR (Xunta de Galicia). MV está financiada por el programa Isidro Parga Pondal (Xunta de Galicia). El Dr. Oscar Arribas contribuyó significativamente a la obtención de muestras en el campo, así como Marta Rúa y Ricardo Ferreiro. Eva Fernández y Hanna Jerôme participaron en el trabajo de laboratorio. David Romero colaboró en la elaboración de la figura 3. Todas las muestras fueron obtenidas con los oportunos permisos administrativos.

## BIBLIOGRAFÍA

ALJANABI, S.M. & MARTÍNEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.

ALMEIDA, A.P.; ROSA, H.D.; PAULO, O.S. & CRESPO, E.G. 2002. Genetic differentiation of populations of Iberian rock-lizards *Iberolacerta* (*Iberolacerta*) sensu Arribas (1999). *J. Zool. Syst. Evol. Research*, 40: 57-64.

ARNOLD, E.N. 1987. Resource partition among lacertid lizards in southern Europe. *J. Zool., Lond. (B)*, 1: 739-782.

ARRIBAS, O.; CARRANZA, S. & ODIERNA, G. 2006. Description of a new endemic species of mountain lizard from Northwestern Spain: *Iberolacerta galani* sp. nov. (Squamata: Lacertidae). *Zootaxa*, 1240: 1-55.

ARRIBAS, O.J. 1996. Taxonomic revision of the Iberian *Archaeolacertae* I.: A new interpretation of the geographical variation of *Lacerta monticola* Boulenger, 1905 and *Lacerta cyreni* Müller & Hellmich, 1937 (Squamata: Sauria: Lacertidae). *Herpetozoa*, 9: 31-56.

BALADO, R., BAS, S. & GALÁN, P. 1995. Anfibios e réptiles. In: *Atlas de Vertebrados de Galicia*. Vol. 1. Consello da Cultura Galega y Sociedade Galega de Historia Natural (Eds.): 65-170. Agencia Gráfica, S. A. Santiago de Compostela.

BOUDJEMADI, K. MARTIN, O. SIMON, J.C. & ESTOUP, A. 1999. Development and cross-species comparison of microsatellite markers in two lizard species, *Lacerta vivipara* and *Podarcis muralis*. *Molecular Ecology* 8 (3): 518-520.

CARRANZA, S., ARNOLD, E.N. & AMAT, F. 2004. DNA phylogeny of *Lacerta* (*Iberolacerta*) and other lacertine lizards (Reptilia: Lacertidae): did competition cause long-term mountain restriction? *Sistematics and Biodiversity*, 2: 57-77.

CLEMENT, M., POSADA, D. & CRANDALL, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1660.

CROCHET, P.-A.; 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.

GALÁN, P. 1982. Nota sobre las *Lacerta monticola* Boulenger, 1905, de las zonas costeras del Norte de Galicia. *Doñana, Acta Vertebrata*, 9: 380-384.

GALÁN, P. 1999a. Declive y extinciones puntuales en poblaciones de baja altitud de *Lacerta monticola cantabrica*. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.*, 10: 47-51.



- GALÁN, P. 1999b. *Conservación de la herpetofauna gallega. Situación actual de los anfibios y reptiles de Galicia*. Universidade da Coruña. Monografía Nº 72. A Coruña.
- GALÁN, P. 2005. Herpetofauna de Galicia: situación actual y amenazas que inciden en su conservación. *Recursos Rurais*, 2: 51-64.
- GALÁN, P. & Fernández, G. 1993. *Anfibios e réptiles de Galicia*. Ed. Xerais. Vigo
- GUITIÁN RIVERA, L. 2002. La destrucción histórica del bosque en Galicia. *Semata, Ciências Sociais e Humanidades*, 13: 105-166.
- MAYER, W. & ARRIBAS, O.J. 2003. Phylogenetic relationships of the European lacertid genera *Archaeolacerta* and *Iberolacerta* and their relationships to some other 'Archaeolacertae' (sensu lato) from the Near East, derived from mitochondrial DNA sequences. *Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 41, 157-161.
- NEMBRINI, M. & OPPLIGER, A. 2003. Characterization of microsatellite loci in the wall lizard *Podarcis muralis* (Sauria: Lacertidae). *Molecular Ecology Notes*, 3: 123-124.
- PÉREZ-MELLADO, V. 2002. *Lacerta monticola* Boulenger, 1905. Lagartija serrana. In: *Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España*. Pleguezuelos, J. M.; Márquez, R. & Lizana, M. (Eds.): 227-229. Dir. Gen. Conservación de la Naturaleza-A.H.E. Madrid.
- PINHO, C. SEQUEIRA, F. GODINHO, R. HARRIS, D.J. & FERRAND, N. 2004. Isolation and characterization of nine microsatellite loci in *Podarcis bocagei* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 286-288.
- RAMIL, P.; MUÑOZ, C.; GÓMEZ ORELLANA, L. & FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, C. 2002. Historia ecológica de Galicia: modificaciones del paisaje a lo largo del Cenozoico. *Semata, Ciências Sociais e Humanidades*, 13: 67-103.
- SUTHERLAND, W.J. (ed.). 1996. *Ecological Census Techniques: a Handbook*. Cambridge University Press. Cambridge.
- TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A. & SING, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.
- VANHOODYDONCK, B. & VAN DAMME, R. 1999. Evolutionary relationships between body shape and habitat use in lacertid lizards. *Evolutionary Ecology Research*, 1: 785-805.
- XUNTA DE GALICIA. 2005. Decreto 88/2007 de 19 de abril, de la Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible, por el que se regula el Catálogo gallego de especies amenazadas. *Diario Oficial de Galicia*, 89: 7409-7423.