

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de seis especies endémicas de geckos en las Islas Galápagos

María Victoria Suárez Cadena

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero/a en Biotecnología

Quito, 15 de mayo de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de seis
especies endémicas de geckos en las Islas Galápagos**

María Victoria Suárez Cadena

Nombre del profesor, Título académico

Gabriela Pozo Andrade, MBS.

Quito, 15 de mayo de 2024

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: María Victoria Suárez Cadena

Código: 00212382

Cédula de identidad: 1721324109

Lugar y fecha: Quito, 15 de mayo de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Phyllodactylus sp. es un género de salamanquesas endémicas de las Islas Galápagos. A pesar de ser el único género de geckos endémicas presente en este archipiélago, no se conoce mucho sobre su genética. Las especies endémicas enfrentan desafíos inherentes, como poblaciones reducidas y se puede añadir la influencia antropogénica en algunos casos. Por consiguiente, su estudio es crucial para evaluar la viabilidad a largo plazo y fomentar su conservación. Las especies estudiadas incluyen *P. galapagensis*, *P. simpsoni*, *P. andysabini*, *P. baurii*, *P. leei* y *P. darwini* que están distribuidas en islas habitadas por el ser humano. Se empleó la técnica de secuenciación de ADN asociada al sitio de restricción (RAD-Seq), para analizar la diversidad genética y estructura poblacional de 93 individuos de las especies mencionadas. Se utilizaron herramientas bioinformáticas como Stacks 2.65 para el procesamiento de secuencias y se obtuvo 30,353 loci. Para los análisis se utilizaron los programas VCFtools v.0.1.5, IQ-TREE v1.6.12, Fitchi(Matschiner, 2016), *populations* y R. Los resultados muestran que *P. darwini* se distingue como la especie más genéticamente distante, posiblemente debido a eventos de colonización distintos en el género *Phyllodactylus*. Se ratifica la relación entre *P. galapagensis*, *P. baurii*, *P. simpsoni* y *P. andysabini*, como previamente fue sugerido. Además, se observa una similitud genética entre *P. simpsoni* y *P. andysabini*. Se evidencian diferencias genéticas significativas entre las seis especies estudiadas, de acuerdo al estadístico F_{ST} . Finalmente, resalta la baja diversidad genética (H_e) dentro de cada especie de este género de geckos. Siendo esta información importante para entender el estado de las especies endémicas. Así como, la salud de sus poblaciones y su viabilidad a futuro para contribuir al desarrollo de planes de conservación.

Palabras clave: geckos, especies endémicas, diversidad genética, estructura poblacional, *Phyllodactylus*, Islas Galápagos, RAD-Seq.

ABSTRACT

Phyllodactylus sp. is a genus of geckos endemic to the Galápagos Islands. Despite being the only endemic gecko genus present in this archipelago, little is known about their genetics. Endemic species face inherent challenges such as reduced populations, which can be exacerbated by anthropogenic influences in some cases. Therefore, studying them is crucial to assess their long-term viability and promote their conservation. The studied species include *P. galapagensis*, *P. simpsoni*, *P. andysabini*, *P. baurii*, *P. leei*, and *P. darwini*, which are distributed on islands inhabited by humans. The restriction site-associated DNA sequencing (RAD-Seq) technique was employed to analyze the genetic diversity and population structure of 93 individuals from the mentioned species. Bioinformatics tools such as Stacks 2.65 were used for sequence processing, yielding 30,353 loci. For analyses, programs VCFtools v.0.1.5, IQ-TREE v1.6.12, Fitchi(Matschiner, 2016), populations, and R were utilized. The results indicate that *P. darwini* is the most genetically distinct species, possibly due to different colonization events within the genus *Phyllodactylus*. The relationship between *P. galapagensis*, *P. baurii*, *P. simpsoni*, and *P. andysabini* is confirmed, as previously suggested. Additionally, genetic similarity is observed between *P. simpsoni* and *P. andysabini*. Significant genetic differences among the six studied species are evidenced according to the F_{ST} statistic. Lastly, the low genetic diversity (H_e) within each species of this gecko genus is highlighted. This information is important for understanding the status of endemic species. As well as, the health of their populations and their future viability to contribute to the development of conservation plans

Keywords: geckos, endemic species, genetic diversity, population structure, *Phyllodactylus*, Galápagos Islands, RAD-Seq.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	11
2. Metodos.....	15
3. Resultados	18
4. Discusión.....	20
5. Conclusiones	24
6. Tablas.....	25
7. Figuras.....	26
8. Referencias bibliográficas.....	29
9. Anexos	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del análisis FastQC para las secuencias concatenadas de la hebra Forward y Reverse con secuenciación Illumina.....	25
Tabla 2. Evaluación de la diversidad genética (Heterocigosidad esperada (He)) en 93 individuos del género <i>Phyllodactylus</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Revisión de integridad del ADN extraído en gel de agarosa al 1.5%.....	26
Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) de 93 geckos endémicos de las Galápagos.....	26
Figura 3. Árbol filogenético de seis especies del género <i>Phyllodactylus</i> . Árbol construido con IQTREE v1.6.12 y visualizado usando el package ape, R. Mapa de las Islas Galápagos muestreadas.....	27
Figura 4. Red de haplotipos de seis especies del género <i>Phyllodactylus</i> . Hecha con el algoritmo de Fitchi, parámetros -p -m 0.5.....	28
Figura 5. Mapa de calor de una medida de divergencia genética entre especies (estadístico FST) del género <i>Phyllodactylus</i> , comparación realizada por pares.....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Información sobre los individuos muestreados en este estudio en las islas galápagos (Laboratorio de Zoología Terrestre, 2023).....	41
---	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las Islas Galápagos y su estudio

Las Islas Galápagos son un archipiélago de origen volcánico en el Pacífico, situado a 1000 km de Ecuador continental. Este comprende 13 islas mayores con un área superior a 10 km², 6 islas con un área entre 1 km² a 10 km² y 215 islotes de tamaño reducido (Fundación PACÍFICO, 2020). Cuatro de estas islas mayores son pobladas: Isabela, Santa Cruz, San Cristóbal y Floreana (Parque Nacional Galápagos, s. f.). Estas han sido de gran interés desde 1835 con el viaje de Charles Darwin. Dentro de las razones está su gran actividad sísmica y volcánica que permite ilustrar los procesos de formación geológica y su impacto en la biodiversidad. Además, el aislamiento extremo que tiene del continente hace que se desarrollen especies singulares con historias evolutivas interesantes, entre estas reptiles como tortugas gigantes, iguanas terrestres, lagartijas y geckos (UNESCO, s. f.).

1.2 Generalidades del género *Phyllodactylus*

El género *Phyllodactylus* (familia Gekkonidae) abarca 58 especies de reptiles, de las cuales se han descrito siete en los últimos años (Arteaga et al., 2019; Torres-Carvajal et al., 2016). Su distribución geográfica está en su mayoría en América Central y América del Sur. Se menciona que en México existen 17 especies, en Perú 15 y en las Islas Galápagos 12. En general, se ha descrito que son especies nocturnas, colocan huevos una o dos veces al año, con su época reproductiva entre los meses de septiembre y enero. Principalmente se alimentan de arañas e insectos pequeños (Uetz et al., 2020). Finalmente, este género se destaca porque las especies son crípticas, es decir, poco diferenciadas morfológicamente (Arana, 2021).

1.3 Género *Phyllodactylus* en las Galápagos

En las Islas Galápagos, se han descrito 11 especies endémicas del género *Phyllodactylus* (familia Phyllodactylidae) (Arteaga et al., 2019). De estas, 6 se encuentran en islas habitadas por el ser humano: *Phyllodactylus leei* y *P. darwini* en Isla San Cristóbal, *P. galapagensis* en Santa Cruz, *P. baurii* en Floreana, *P. simpsoni* en Isabela y Fernandina (no habitada por humanos) y *P. andysabini* en Isabela (Arteaga et al., 2019; Carvajal, 2010b, 2010c, 2010a; Torres-Carvajal et al., 2016). Estas especies endémicas pueden hallarse en ambientes naturales o aquellos influenciados por la actividad humana, donde han desarrollado adaptaciones para la caza nocturna en postes de luz y paredes. A pesar de su capacidad de adaptación, se ven afectadas por cambios ambientales causados por la actividad antropogénica y la pérdida de hábitat. Además, enfrentan impactos ambientales debido a especies introducidas que pueden convertirse en competidores, depredadores o incluso portadores de nuevas enfermedades, tal como ha ocurrido en otras poblaciones de geckos insulares (Bungard et al., 2014; Case & Bolger, 1991; Croak et al., 2008; Williams et al., 2020). Por otro lado, 4 especies de geckos introducidos también se reportan en los últimos dos siglos en islas habitadas por el ser humano (familia Phyllodactylidae: *Phyllodactylus reissii*; Gekkonidae: *Hemidactylus frenatus* y *Lepidodactylus lugubris* y Sphaerodactylidae: *Gonatodes caudiscutatus*) (Cisneros-Heredia, 2018; Jadin et al., 2009; Phillips et al., 2012).

Aunque no hay información suficiente, algunas especies del género se han agregado a la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como en peligro. Cabe recalcar que, especies como *P. darwini*, *P. galapagensis* y *P. leei* abordadas en este estudio aparecen como “casi amenazadas” por su decrecimiento poblacional. *P. baurii* es un caso de revisión por falta de información (*The IUCN Red List of Threatened Species*, s. f.).

1.4 Estudios biológicos y genéticos previos

El género *Phyllodactylus*, particularmente presente en las Islas Galápagos, ha recibido escasa atención por parte de los investigadores, con pocos estudios realizados. En 1912, se publicó el primer estudio que identificaba 6 especies de *Phyllodactylus* y 3 subespecies para *P. galapagensis* (John Van Denburgh, 1912). Posteriormente, en 1973, se describieron 3 nuevas subespecies en un análisis de 14 poblaciones de geckos en las Islas Galápagos (Arteaga et al., 2019). Torres-Carvajal et al. (2014) llevaron a cabo el primer estudio filogenético para investigar las relaciones evolutivas entre las islas, identificando 10 especies endémicas del género *Phyllodactylus* en las Islas Galápagos, de las cuales, 2 ascendieron de la categoría de subespecies a especies y 2 especies no habían sido descritas hasta ese momento (Torres-Carvajal et al., 2016; Torres-Carvajal et al., 2014). El último enfoque en el estudio de este género ocurrió en 2019, cuando se describieron 2 nuevas especies en la Isla Isabela (*P. simpsoni* y *P. andysabini*) y se construyó un árbol filogenético molecular basado en el análisis genético de 5 marcadores moleculares (Arteaga et al., 2019).

1.5 Diversidad genética y su importancia en especies endémicas

En el estudio de las especies endémicas, al tener un rango restringido y un tamaño de población reducido, es determinante monitorear la estabilidad y la permanencia de estas poblaciones, ya que son más propensas a verse afectadas por disturbios como: deriva génica que causa fluctuaciones aleatorias en las frecuencias alélicas de un gen, depresión por endogamia, cuellos de botella y otros como cambios demográficos, ambientales y catastróficos que aceleran el declive de poblaciones reducidas (Martínez-Tillería et al., 2018). Estos impactan negativamente en la dinámica poblacional, estructura y reducen el tamaño efectivo, que se entiende como los individuos que van a dar lugar a descendencia en la siguiente

generación (Acreche, 2003). Así, se reduce el fitness de la especie y la salud genética de las mismas, poniendo en riesgo su viabilidad a futuro (Martínez-Tillería et al., 2018).

Por otro lado, la diversidad genética es el pilar básico de la biodiversidad porque explica las variaciones heredables ocurrientes en un organismo, entre individuos dentro de una población y entre poblaciones dentro de una especie. De tal forma, resulta importante estudiarla en el campo de la genética de poblaciones endémicas y evolución porque estas disciplinas se encargan de dilucidar la conservación y protección de estas especies (Ferrer Marti, 2008; Rimieri, 2017).

1.6 RAD-Seq en estudios biológicos

RAD-Seq (Secuenciación de ADN asociada al sitio de restricción) es una técnica de secuenciación que identifica variaciones genéticas utilizando restricción enzimática para fragmentar el ADN y secuenciar regiones específicas del genoma usando tecnología Illumina (Etter et al., 2011). Sus principales pasos son digestión enzimática, ligación de adaptadores multiplex RAD, sonicación, reparación de extremos, ligación de adaptadores de secuenciación, selección de tamaño, amplificación por PCR y la purificación (Shen, 2023). Esta técnica permite identificar miles de SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) a la vez y por esto ha sido ampliamente seleccionada en estudios de poblaciones, pero también por su buena profundidad, ser económicamente accesible y no necesitar un procedimiento complejo (Baird et al., 2008). De tal forma, se acopla a varios diseños experimentales que quieran genotipar y descubrir SNPs, pero también en el campo de la genética cuantitativa y estudios filogeográficos (Davey & Blaxter, 2010).

2. METODOS

2.1 Recolección de muestras y extracción de ADN

La recolección de 95 muestras se realizó por el Laboratorio de Zoología Terrestre de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador. Se obtuvo tejido de la cola de los individuos en las Islas Galápagos (Ver Anexo 1). La extracción de ADN fue hecha por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la misma Universidad con el kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilder, GER). Se modificó el protocolo repitiendo el lavado con los buffers AW1 y AW2, y el ADN se eluyó en un volumen final de 34 μ L. La cuantificación del ADN se realizó utilizando fluorometría Qubit, y los índices de calidad, A260/A280 y A260/A230, se mediante espectrofotometría Nanodrop. Finalmente, se revisó la integridad del ADN en un gel se agarosa al 1,5% (p/v) (Figura 1). El ADN de todos los individuos se normalizó a 50 μ L de 20 ± 5 ng/ μ L, según los requerimientos de la empresa Floragenex (Eugene, OR, USA).

2.2 Técnica de RAD-Seq

Floragenex realizó la técnica RAD-Seq. El ADN genómico se evaluó y controló su calidad (QA/QC), se digirió con SbfI y se seleccionaron fragmentos de 169 pb. La eficiencia y especificidad de la amplificación por PCR se evaluaron mediante el Analizador de Fragmentos Agilent (Agilent, s. f.) y/o electroforesis en gel de agarosa. La secuenciación de las bibliotecas RAD-Seq se hizo con la plataforma Illumina NovaSeq6000 (Illumina, s. f.-b). Las corridas de secuenciación se realizaron con lecturas pareadas de 150 pares de bases, empleando el kit NovaSeq6000 S Prime 300 cycle (Sp300), en dos carriles. Los datos de secuenciación se proporcionaron en formato fastq para análisis posteriores.

2.3 Ensamblaje de RAD-seq usando Stacks 2.65

Floragenex envió cuatro archivos con los resultados de las secuencias de la hebra forward y reverse para los dos carriles. Estos fueron concatenados para obtener un archivo de

las secuencias forward y otro de las secuencias reverse. Los dos archivos resultantes fueron analizadas usando FastQC (Illumina, s. f.-a).

Se empleó Stacks 2.65 para procesar las lecturas y generar un catálogo de loci. Un análisis *de novo* consiste en 6 pasos principales; primero, *process_radtags* separa y limpia las lecturas por individuo. Los 3 pasos siguientes son los principales del pipeline (*denovo_map.pl*): *ustacks* construye los loci, *cstacks* crea un catálogo de los loci y *sstacks* une los individuos al catálogo. Después, *gstacks* ensambla contigs y llama a los SNPs. Finalmente, *populations* filtra los datos, calcula estadísticas y exporta formatos útiles para otros estudios (Rivera-Colón & Catchen, 2022). *Process_radtags* se corrió con los siguientes parámetros: `barcode-dist-1 of 3`, `-c/-clean`, `-q/-quality` y `-r/-rescue`, lo que permitió conservar más el 80% de las secuencias.

Se aplicó la metodología propuesta por Paris et. al. (2017) y Rivera-Colón & Catchen (2022) descrita para *denovo_map.pl*. Para esto, se ajustaron los parámetros *-M* (diferencias entre stacks para unirlos en un solo locus) y *-n* (diferencias en stacks entre individuos para construir el catálogo de loci), en el procesamiento con *ustacks* y *cstacks*. Se hicieron ensayos de prueba y error con rangos del 1 al 7. Para hallar los mejores parámetros, se revisó la diferencia entre loci para acercarse a cero en *-R 80* (loci polimórficos presentes en al menos el 80% de las muestras) (Rivera-Colón & Catchen, 2022). Los parámetros óptimos fueron *-M 3*, *-n 3* y *-R 80*. Finalmente, en módulo de *populations* se especificaron las poblaciones y las especies de cada muestra. Durante el tratamiento de los datos, se depuró loci e individuos para excluir aquellos con un alto grado de datos faltantes y una profundidad baja. Las muestras con menos del 35% de profundidad se eliminaron utilizando VCFtools v.0.1.5 con el comando *-mean_depth*. Además, se eliminaron los loci que no estuvieran dentro del rango de cobertura de 15 a 200 (*-min-meanDP 15* y *-max-meanDP 200*). Como resultado, se utilizaron 93 de 95 individuos y 30,353 loci en un archivo tipo VCF en los análisis posteriores (Ver Anexo 1).

2.4 Gráfico de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) se realizó para evaluar la variación genética entre especies de *Phyllodactylus* utilizando el paquete *adeigenet* (Jombart & Ahmed, 2011) en R, siguiendo el guion de Cerca (2021) y Rivera-Colón, et al. (2022).

2.5 Árbol filogenético

Se convirtió el archivo VCF a formato Nexus con los sitios variables a un archivo PHYLIP utilizando el script *vcf2phyip.py* (Ortiz, 2019). Posteriormente, se utilizó el programa IQ-TREE v1.6.12 (Chernomor et al., 2016; Minh et al., 2020; Nguyen et al., 2015) para inferir la relación filogenética entre los 93 individuos. Se aplicó un modelo General Time Reversible (GTR) con corrección de sesgos para SNPs (ASC) utilizando la opción *-m GTR+ASC*. Se realizaron 1000 bootstrap replicates (Minh et al., 2020). El árbol resultante se visualizó en R con el paquete *ape* (Paradis & Schliep, 2019) y el código Newick generado en el paso anterior.

2.6 Red de haplotipos

Se construyó la red de haplotipos utilizando el algoritmo de Fitchi (Matschiner, 2016) y el archivo NEXUS como input. Se utilizaron los parámetros *-m 0.3* y *-p auto* para mostrar las transiciones y transversiones entre las secuencias.

2.7 Análisis de estructura poblacional y diferenciación genética

Para saber el nivel de diferenciación genética entre las especies, se estimó el estadístico F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) usando VCFtools v.0.1.5 (Danecek et al., 2011). Se tomó en cuenta la comparación entre cada par de especies.

2.8 Análisis de diversidad genética

Para entender la diversidad genética entre especies se calculó la heterocigosidad esperada (H_e) usando el software *populations* en Stacks 2.65 (Rivera-Colón & Catchen, 2022).

3. RESULTADOS

3.1 Concentración e índices de calidad del ADN extraído

Las concentraciones obtenidas del ADN extraído de las 95 muestras estuvieron en un rango de 8.92 ng/μL a 25.8 ng/μL. Los índices de calidad presentaron valores de 1.77 a 3.42, en A260/A280 y 0.3 a 4.15 en A260/A230 (Ver Anexo 1). Adicionalmente, en la Figura 1 se muestra un gel de agarosa al 1.5% con varias muestras, en donde las bandas son nítidas, revelando buena calidad (Figura 1).

3.2 Calidad de secuencias y loci obtenidos después del procesamiento con Stacks 2.65

En la Tabla 1, se muestra un resumen de los resultados del análisis FastQC para las hebras forward y reverse después del secuenciamiento con Illumina. La técnica RAD-Seq procesó 1,021,167,325 secuencias forward y el número equivalente de secuencias reverse. Además, ninguna secuencia se marcó como de baja calidad. En ambas hebras, el tamaño de los fragmentos es de 169 pb, lo que es congruente con el tamaño de fragmentos seleccionado para la secuenciación. El contenido de GC varía mínimamente entre hebras. Finalmente, la calidad media del secuenciamiento dada por los Phred Score, se muestra consistente en las dos hebras, con un valor de 36. Luego de realizar el pipeline *denovo_map.pl* de Stacks 2.65 se obtuvieron 30,353 loci polimórficos para el análisis.

3.3 Análisis de estructura poblacional y diferenciación genética

En la Figura 2 se presenta la distribución de las muestras según su grado de similitud, basado en el análisis de componentes principales (PCA). Se observa el primer acercamiento a la distribución de las especies agrupadas en 3 diferentes clústers. En el clúster 1, se encuentra agrupado *P. darwini*. En el segundo clúster se encuentra solo *P. leei* y finalmente, en el tercero se encuentran *P. galapagensis*, *P. simpsoni*, *P. andysabini* y *P. baurii*. Se observa que esta distribución explica el 51% de la variación de los datos (PC1=28%; PC2=23%).

El árbol filogenético sin raíz (Figura 3B) exhibe cinco ramas que representan a las especies del género *Phyllodactylus*. Se evidencia que *P. andysabini* se encuentra integrado en la rama correspondiente a *P. simpsoni*. Los números al final de cada bifurcación denotan la identificación del individuo respectivo. Además, se aprecia una agrupación de los individuos según la isla de origen (Figura 3A y Figura 3B).

La red de haplotipos (Figura 4) muestra la agrupación de las 6 especies estudiadas en cinco grupos distintos. Cada círculo representa un individuo diferente con un haplotipo único, mientras que cada segmento nodal representa las sustituciones nucleotídicas. La divergencia entre los grupos está determinada por las transiciones entre las secuencias, y la longitud de las ramas refleja las transversiones inferidas por el algoritmo de Fitchi. (Matschiner, 2016)

En la Figura 5, se presenta el mapa de calor con los valores del estadístico F_{ST} de divergencia genética entre especies. Este estadístico representa la proporción de la varianza genética en una población en relación al total de la varianza genética. Los valores oscilan entre 0 y 1, siendo 1 el grado más alto de diferenciación (University of Wyoming, s. f.). Esta muestra valores que varían desde -0.002 hasta 0.984. Se observa que las especies más relacionadas son *P. simpsoni* y *P. andysabini*, con un valor de diferenciación de -0.002, mientras que las especies más divergentes son *P. leei* y *P. darwini*, con un valor de 0.984.

3.4 Heterocigosidad esperada

Finalmente, se calculó de heterocigosidad esperada (H_e) que es una medida de variación genética en una población que indica la proporción de los heterocigotos esperados bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg. Tiene sus valores de 0 a 1, siendo cero baja diversidad genética y 1 alta diversidad (Harris & DeGiorgio, 2016). La Tabla 2, muestra los valores obtenidos de la heterocigosidad esperada (H_e) de cada especie. Estos varían desde 0.0175 hasta 0.0794. Se observa que la especie con menor diversidad genética es *P. baurii* (0.0175), en tanto la especie con mayor heterocigosidad esperada es *P. simpsoni* (0.0794).

4. DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de muestras y evaluación de calidad

Para este estudio se obtuvieron muestras representativas de seis especies analizadas: *P. galapagensis*, *P. simpsoni*, *P. andysabini*, *P. baurii*, *P. leei* y *P. darwini*, de acuerdo con su distribución. Estas se tomaron de poblaciones distintas en lugares diferentes. Se evidencian concentraciones variables (Anexo 1). Sin embargo, estas fueron normalizadas a 20 ± 5 ng/ μ L, permitiendo la observación en geles de agarosa y siendo suficiente para técnicas de secuenciación de nueva generación como Illumina (Genewiz, s. f.). Adicionalmente, el gel de agarosa (Figura 1) presenta bandas nítidas y sin esparcimiento lo que demostró que el ADN es íntegro y no degradado (DOE Joint Genome Institute, 2012). Los estándares de calidad A260/280 y A260/230 se cumplieron en rangos de 1.8 – 2.0 y 1.8 – 2.2 respectivamente (Thermo Scientific, 2019), con excepción de pocas muestras aceptadas por Floragenex. La calidad de las lecturas resultantes de la secuenciación es excelente con un Phred Score general de 36, lo que indica una precisión de secuenciación por Illumina del 99.90% aproximadamente (ZYMO, 2021). Además, se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado por la enzima de restricción SbfI y ninguna secuencia fue marcada como de mala calidad. Esto demuestra que las lecturas son aptas para los estudios correspondientes.

Por último, la técnica de RAD-Seq proporciona una diferenciación más precisa de los individuos estudiados, aumentando la fiabilidad de las asociaciones con el uso de un extenso conjunto de marcadores moleculares (Zeggini & Ioannidis, 2009), en este caso, 30,353 loci polimórficos. Ofrece una mayor profundidad de cobertura por lectura, incrementando la confianza en los resultados (Andrews et al., 2016).

4.2 Estructura poblacional y diferenciación genética

En la Figura 2, gráfico de componentes principales (PCA), se identificó 3 clústers. Uno de ellos compuesto por *P. galapagensis*, *P. simpsoni*, *P. andysabini* y *P. baurii*. En estudios previos se agrupaba a *P. baurii*, *P. simpsoni*, y a *P. andysabini*, dentro de *P. galapagensis* (John Van Denburgh, 1912). De hecho, hasta el estudio de 1973 *P. baurii* y *P. simpsoni* eran subespecies de *P. galapagensis* (Lanza, 1973) y es después de esto, en 2014, que se eleva a estas a un estado de especies (Torres-Carvajal et al., 2014). Por lo que, resulta esperable la relación hallada en el PCA, que se ve respaldada con el acercamiento en el árbol filogenético (Figura 3B) y la red de haplotipos (Figura 4).

Por otro lado, *P. darwini* y *P. leei* se destacan como las especies más distantes, formando los clústeres 1 y 2 respectivamente. Esto coincide con estudios anteriores sobre la filogeografía de estas especies (Arteaga et al., 2019; Torres-Carvajal et al., 2016; Torres-Carvajal et al., 2014). Además, las islas más cercanas a San Cristóbal, donde se encuentran estas dos especies, son Santa Cruz a 103 km y Floreana a 121 km, distancias mayores comparadas, por ejemplo, con los 30 km entre Santa Cruz e Isabela (Google, s. f.).

Finalmente, los resultados sugieren que *P. andysabini* está estrechamente relacionada con *P. simpsoni* (Figuras 2, 3B y 4). Hasta 2019 se consideraba a *P. simpsoni* y *P. andysabini* como una misma especie, lo que es congruente con el solapamiento en la distribución geográfica de ambas especies en la Isla Isabela (Arteaga et al., 2019; Torres-Carvajal et al., 2016; Torres-Carvajal et al., 2014). Sin embargo, el estudio de Arteaga et al. (2019) basado en identificación morfológica y análisis de cinco marcadores moleculares (fragmentos 12S, 16S, ND4, c-mos y RAG1) las identificó como especies distintas. Su diferenciación se basó en cinco marcadores genéticos y en la comparación de datos morfológicos y de coloración. Las diferencias fenotípicas incluyen la ausencia de contacto entre supranasales y la presencia de áreas densamente punteadas en la garganta. Sin embargo, se mencionó que la separación es preliminar y sugirieron estudiar el caso con más marcadores genéticos (Arteaga et al., 2019).

En la Figura 5, se observa un valor cercano a cero entre *P. simpsoni* y *P. andysabini*, lo que sugiere también un acercamiento genético entre estas especies. Al ser especies descritas en 2019, la información disponible es limitada. Y, se sugiere que una separación reciente podría explicar la cercanía genética (Arteaga et al., 2019). Adicionalmente, se registra un valor negativo en la correlación porque puede que la muestra sea muy pequeña en comparación con el número de alelos evaluados (Gerlach et al., 2010). No obstante, varios estudios consideran apropiado tomar valores negativos como cero para la estimación, lo que implica poblaciones idénticas (Thavornkanlapachai et al., 2021; Willing et al., 2012). Cabe recalcar, que esta cercanía genética se ve respaldada por los otros resultados presentados y se sugiere revisar la clasificación porque parecería que están estrechamente relacionados.

Según Wright (1978), los valores de F_{ST} se interpretan así: 0-0.05 indica poca diferenciación, 0.05-0.15 diferenciación moderada, 0.15-0.25 gran diferenciación, y más de 0.25 diferenciación extrema (Viveros-Viveros et al., 2014). La Figura 5 muestra que *P. darwini* presenta los valores más altos de diferenciación genética en comparación con las otras especies, con rangos de 0.972 a 0.991. Con respecto a esto, estudios previos mencionan que este género tuvo mínimo dos eventos de colonización originarios de América del Sur. Se presume que la primera colonización se dio hace 13.3 millones de años (Ma) y dio lugar a una radiación de varias especies en islas modernas, con excepción de *P. darwini* en San Cristóbal. Posteriormente, el ancestro de *P. darwini*, que se originó en tierras bajas occidentales de Sudamérica, colonizó el archipiélago hace 3.1 Ma y se diversificó por dispersión y vicarianza, lo que está respaldado por la cercanía genética de *P. darwini* a especies continentales (Duellman, William E. et al., 1979; Torres-Carvajal et al., 2014; Werner & Hoernle, 2003).

Además, se observa que todos los otros valores son mayores a 0.671, lo que indica una alta diferenciación entre las especies. En los archipiélagos de origen volcánico, se esperan valores altos de diferenciación debido a las barreras oceánicas entre islas (Mairal et al., 2015).

Se observa también que en el caso de *P. darwini* y *P. leei* existe una diferenciación alta a pesar de estar distribuidos en la isla San Cristóbal. Esta posible separación de hábitats dentro de las islas volcánicas puede atribuirse a erupciones secundarias y desplazamiento de tierras (Mairal et al., 2015). Además, la diferencia de colonizaciones previamente mencionada y la actividad antropogénica también podrían explicar esta diferenciación, dado que se ha observado que afecta a otras especies de reptiles (Bungard et al., 2014; Croak et al., 2008; Towns et al., 2001).

4.3 Diversidad Genética

En la Tabla 2, se observan en general valores bajos cercanos a cero. Sin embargo, esto es comparable con otros estudios similares en geckos insulares de Japón, en donde se obtuvo valores de 0.089 - 0.110 en *Gekko japonicus* y 0 – 0.018 en *Gekko tawaensis* con la técnica de variación en alozimas (Toda et al., 2003). Por otro lado, en estudios con microsatélites se ha encontrado valores de 0.86 en *Gehyra variegata* (Hoehn & Sarre, 2006) y 0.160 – 0.917 en *Gekko swinhonis* (Li & Zhou, 2007). En este caso, se debe considerar que los microsatélites estudian pocos loci, usualmente menos de 20, en contraposición con los miles analizados con RAD-Seq (Zimmerman et al., 2020). Además, los microsatélites se enfocan en estudiar loci polimórficos, por lo que, pueden arrojar valores sobreestimados (Queirós et al., 2015). Por su lado, se ha mencionado a RAD-Seq como una herramienta buena para estimar la diversidad genética de las especies por ser más precisos (Zimmerman et al., 2020).

Sin embargo, estos valores bajos pueden estar relacionados al hecho de que se trata de especies endémicas insulares, con una distribución restringida y poblaciones pequeñas, por lo que, aumenta el riesgo de endogamia. Además, pudieron haber experimentado cuellos de botella al momento de su fundación o recientemente (Frankham, 1997; James et al., 2016). Adicionalmente, en general las poblaciones de reptiles muestran baja diversificación por factores como efecto fundador, eventos fortuitos, alopatría y alto riesgo de mortalidad (Queirós et al., 2015).

5. CONCLUSIONES

El género *Phyllodactylus*, distribuido a lo largo de América y especialmente en las Islas Galápagos, ha recibido escasa atención en términos de investigación y la falta de datos impide evaluar adecuadamente el estado actual de estas especies. El presente estudio permitió entender con precisión la estructura y diversidad genética de las especies de *Phyllodactylus* analizadas, gracias a los 30,000 loci utilizados. Se comprobó que *P. darwini* es la especie más distante, mientras que se reafirmó la relación entre *P. galapagensis*, *P. baurii*, *P. simpsoni* y *P. andysabini*, tal como se sugería anteriormente. Además, se observa que *P. simpsoni* y *P. andysabini* están estrechamente relacionados. A su vez, se muestra que las especies analizadas tienen una baja heterocigosidad esperada y una alta diferenciación entre ellas. La aplicación de RAD-Seq, una técnica sencilla que emplea múltiples marcadores moleculares ha proporcionado una inferencia más certera en este ámbito. Finalmente, este estudio destaca la importancia de investigar la diversidad genética de especies endémicas insulares para comprender su estado, adaptación y viabilidad a largo plazo, lo que es fundamental para informar estrategias efectivas de conservación.

6. TABLAS

Tabla 1. Resultados del análisis FastQC para las secuencias concatenadas de la hebra Forward y Reverse con secuenciación Illumina.

	Archivo de lecturas Forward	Archivo de lecturas Reverse
Cifrado	Sanger/Illumina 1.9	Sanger/Illumina 1.9
Secuencias Totales	1,021,167,325	1,021,167,325
Secuencias de mala calidad	0	0
Longitud de secuencias	169	169
%GC	49	48
Promedio de calidad (Phred Scores)	36	36

Tabla 2. Evaluación de la diversidad genética (Heterocigosidad esperada (H_e)) en 93 individuos del género *Phyllodactylus*.

Especie	Heterocigosidad esperada (H_e)
<i>P. simpsoni</i>	0.0794
<i>P. baurii</i>	0.0175
<i>P. leei</i>	0.0507
<i>P. darwini</i>	0.0189
<i>P. galapagensis</i>	0.0595
<i>P. andysabini</i>	0.0425

7. FIGURAS



Figura 1. Revisión de integridad del ADN extraído en gel de agarosa al 1.5%. El ladder de referencia se encuentra en el primer carril. Los números de muestra se encuentran en la parte superior de cada carril.

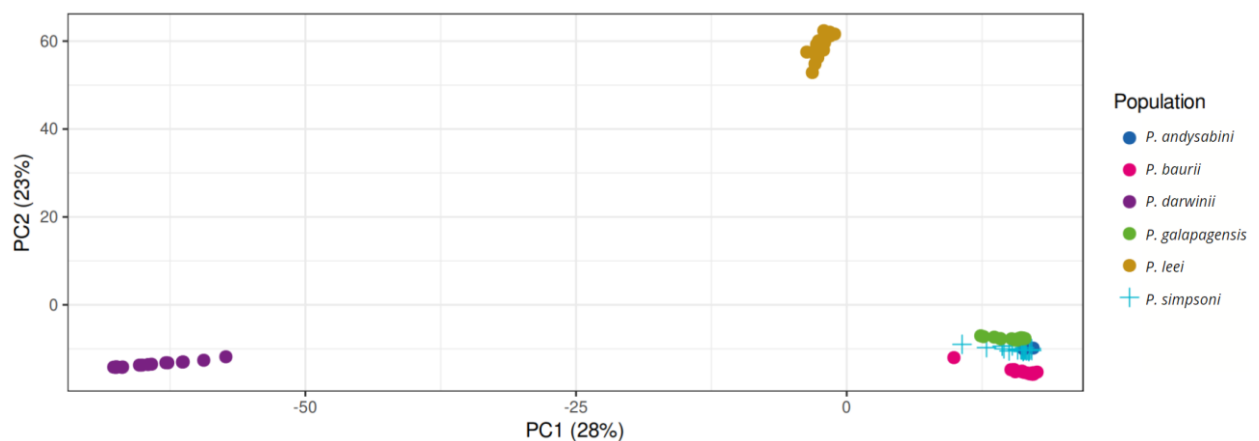


Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) de 93 geckos endémicos de las Galápagos. Los individuos muestreados se encuentran marcados con colores según su especie.

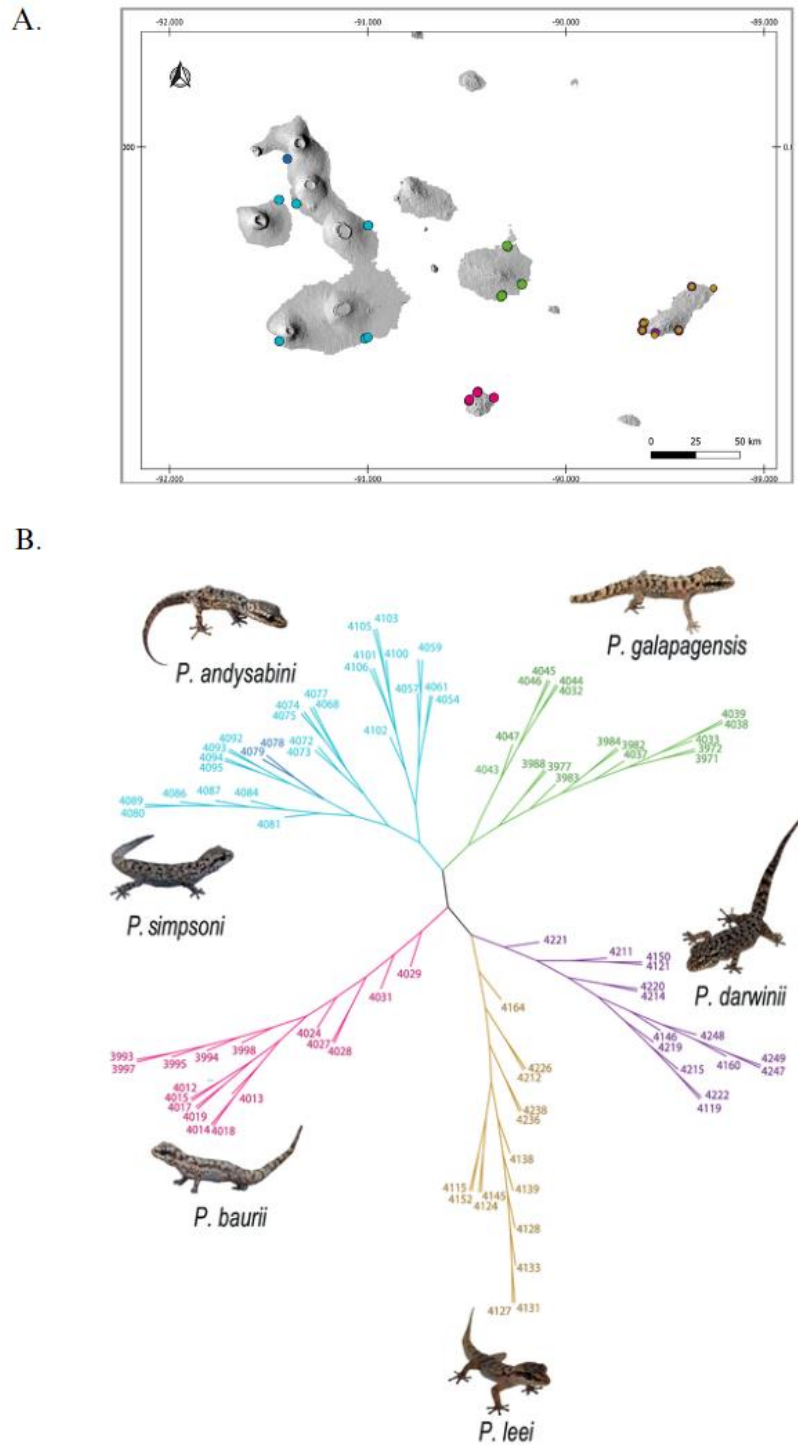


Figura 3. A. Mapa de las Islas Galápagos muestreadas. B. Árbol filogenético de seis especies del género *Phyllodactylus*. Árbol construido con IQTREE v1.6.12 y visualizado usando el package ape, R.

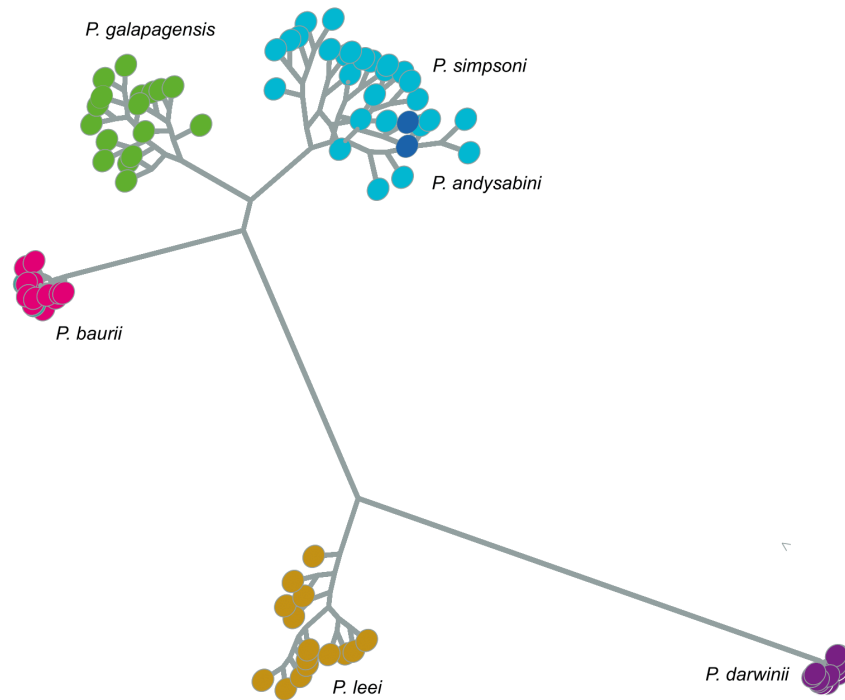


Figura 4. Red de haplotipos de seis especies del género *Phyllodactylus*. Hecha con el algoritmo de Fitchi (Matschiner, 2016), parámetros -p -m 0.5.

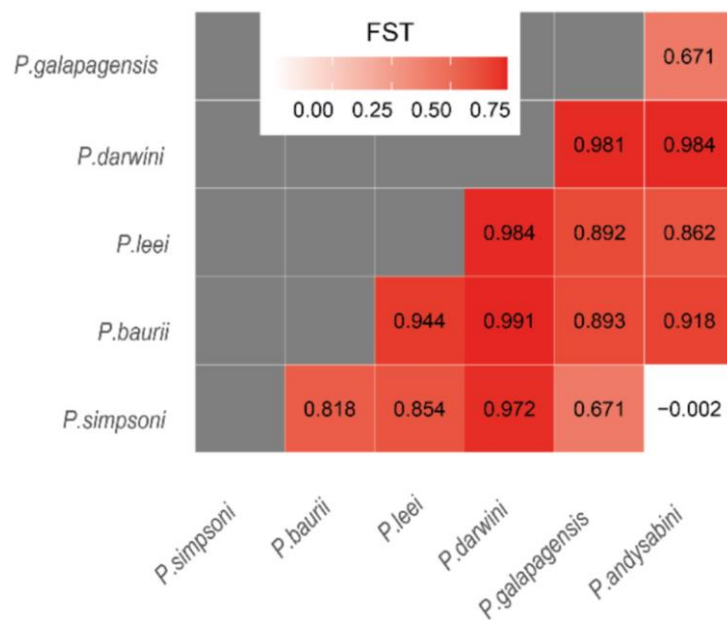


Figura 5. Mapa de calor de una medida de divergencia genética entre especies (Estadístico F_{ST}) del género *Phyllodactylus*, comparación realizada por pares.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acreche, N. (2003). Tamaño efectivo poblacional—Modelos y aplicaciones. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 5, n.º 1.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/5723>
- Agilent. (s. f.). *5200 Fragment Analyzer* [Software]. Recuperado 11 de mayo de 2024, de <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/fragment-analyzer-systems/fragment-analyzer-systems/5200-fragment-analyzer-system-365720>
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature reviews. Genetics*, 17(2), 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>
- Arana, A. (2021). *Estructura genética poblacional de Phyllodactylus sentosus (Squamata: Phyllodactylidae) mediante Genotipado por Secuenciación (GBS)* [Tesis de Grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/17203/Arana_sa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Arteaga, A., Bustamante, L., Vieira, J., Tapia Aguilera, W., Carrión-Tacuri, J., & Guayasamin, J. (2019). *Two new species of leaf-toed geckos (Phyllodactylus) from Isabela islands, Galápagos archipelago, Ecuador* (pp. 172-186).
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE*, 3(10), e3376.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Bungard, M., Jones, C., Tatayah, V., & Bell, D. (2014). The habitat use of two species of day geckos (*Phelsuma ornata* and *Phelsuma Guimbeau*) and implications for conservation

management in Island ecosystems. *Herpetological Conservation and Biology*, 9, 551-562.

Carvajal, A. (2010a). *Phyllodactylus darwini*.

<https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Phyllodactylus%20darwini>

Carvajal, A. (2010b). *Phyllodactylus galapagensis*.

<https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Phyllodactylus%20galapagensis>

Carvajal, A. (2010c). *Phyllodactylus leei*.

<https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Phyllodactylus%20leei>

Case, T. J., & Bolger, D. T. (1991). The role of introduced species in shaping the distribution and abundance of island reptiles. *Evolutionary Ecology*, 5(3), 272-290.

<https://doi.org/10.1007/BF02214232>

Chernomor, O., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). Terrace Aware Data Structure for Phylogenomic Inference from Supermatrices. *Systematic Biology*, 65(6), 997-1008.

<https://doi.org/10.1093/sysbio/syw037>

Cisneros-Heredia, D. F. (2018). The Hitchhiker Wave: Non-native Small Terrestrial

Vertebrates in the Galapagos. En M. de L. Torres & C. F. Mena (Eds.),

Understanding Invasive Species in the Galapagos Islands: From the Molecular to the Landscape (pp. 95-139). Springer International Publishing.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-67177-2_7

Croak, B. M., Pike, D. A., Webb, J. K., & Shine, R. (2008). Three-dimensional crevice structure affects retreat site selection by reptiles. *Animal Behaviour*, 76(6), 1875-

1884. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.08.011>

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., & Durbin, R. (2011). The

variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>

Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: Next-generation population genetics.

Briefings in Functional Genomics, 9(5-6), 416-423.

<https://doi.org/10.1093/bfpg/elq031>

DOE Joint Genome Institute. (2012). *Genomic DNA QC Using Standard Gel Electrophoresis (For Collaborators)*.

Duellman, William E., Duellman, W. E., League, H., Reptiles, S. for the S. of A. and, &

Herpetofauna, S. on the S. A. (1979). *The South American herpetofauna: Its origin, evolution, and dispersal*. Museum of Natural History, University of Kansas.

<https://doi.org/10.5962/bhl.title.3207>

Etter, P. D., Bassham, S., Hohenlohe, P. A., Johnson, E. A., & Cresko, W. A. (2011). SNP

discovery and genotyping for evolutionary genetics using RAD sequencing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 772, 157-178. [https://doi.org/10.1007/978-1-](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1_9)

[61779-228-1_9](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1_9)

Ferrer Marti, I. (2008). *Análisis de la interacción entre factores que afectan la evolución*

molecular, usando datos de diversidad nucleotídica y herramientas bioinformáticas

[[Http://purl.org/dc/dc/mitype/Text](http://purl.org/dc/dc/mitype/Text), Universitat Autònoma de Barcelona].

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=234650>

Frankham, R. (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland

populations? *Heredity*, 78 (Pt 3), 311-327. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.46>

Fundación PACÍFICO. (2020). *Isla Galápagos, Ecuador*. [https://redpacifico.net/es/isla-](https://redpacifico.net/es/isla-galapagos-ecuador/)

[galapagos-ecuador/](https://redpacifico.net/es/isla-galapagos-ecuador/)

Genewiz. (s. f.). *Next Generation Sequencing Sample Submission Guidelines*. Recuperado 14

de mayo de 2024, de <https://www.genewiz.com/Public/Resources/Sample->

Submission-Guidelines/Next-Generation-Sequencing-Sample-Submission-Guidelines/?sc_device=Mobile

Gerlach, G., Jueterbock, A., Kraemer, P., Deppermann, J., & Harmand, P. (2010).

Calculations of population differentiation based on GST and D: Forget GST but not all of statistics! *Molecular Ecology*, *19*(18), 3845-3852.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04784.x>

Google. (s. f.). *Islas Galápagos* [Map].

[https://www.google.com/maps/place/Islas+Gal%C3%A1pagos/@0.1352997,-](https://www.google.com/maps/place/Islas+Gal%C3%A1pagos/@0.1352997,-90.6251218,8z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x9aaa92ee319f2cbf:0x95bebc63839846f2!8m2!3d-0.9537691!4d-90.9656019!16zL20vMDM2NjBi?entry=ttu)

[90.6251218,8z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x9aaa92ee319f2cbf:0x95bebc63839846](https://www.google.com/maps/place/Islas+Gal%C3%A1pagos/@0.1352997,-90.6251218,8z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x9aaa92ee319f2cbf:0x95bebc63839846f2!8m2!3d-0.9537691!4d-90.9656019!16zL20vMDM2NjBi?entry=ttu)

[f2!8m2!3d-0.9537691!4d-90.9656019!16zL20vMDM2NjBi?entry=ttu](https://www.google.com/maps/place/Islas+Gal%C3%A1pagos/@0.1352997,-90.6251218,8z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x9aaa92ee319f2cbf:0x95bebc63839846f2!8m2!3d-0.9537691!4d-90.9656019!16zL20vMDM2NjBi?entry=ttu)

Harris, A. M., & DeGiorgio, M. (2016). An Unbiased Estimator of Gene Diversity with

Improved Variance for Samples Containing Related and Inbred Individuals of any Ploidy. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, *7*(2), 671-691.

<https://doi.org/10.1534/g3.116.037168>

Hoehn, M., & Sarre, S. D. (2006). Microsatellite DNA markers for Australian geckos.

Conservation Genetics, *7*(5), 795-798. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9070-0>

Illumina. (s. f.-a). *FastQC* [Software]. Recuperado 11 de mayo de 2024, de

<https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/fastqc.html>

Illumina. (s. f.-b). *NovaSeq 6000 System* [Software]. Recuperado 11 de mayo de 2024, de

<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html>

Jadin, R., Altamirano, M., Yáñez-Muñoz, M., & Smith, E. (2009). First record of the

common house gecko (*Hemidactylus frenatus*) in Ecuador. *Applied Herpetology -*

APPL HERPETOL, *6*, 193-195. <https://doi.org/10.1163/157075408X394133>

- James, J. E., Lanfear, R., & Eyre-Walker, A. (2016). Molecular Evolutionary Consequences of Island Colonization. *Genome Biology and Evolution*, 8(6), 1876-1888.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw120>
- John Van Denburgh. (1912). *The geckos of the Galapagos Archipelago*.
<http://archive.org/details/biostor-77900>
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070-3071.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Lanza, B. (1973). *On some Phyllodactylus from the Galápagos Islands (Reptilia Gekkonidae)* (pp. 1-34). Museo Zoologico dell'Università di Firenze.
- Li, J., & Zhou, K. (2007). Isolation and characterization of microsatellite markers in the gecko *Gekko swinhonis* and cross-species amplification in other gekkonid species. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 674-677. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01674.x>
- Mairal, M., Sanmartín, I., Aldasoro, J. J., Culshaw, V., Manolopoulou, I., & Alarcón, M. (2015). Palaeo-islands as refugia and sources of genetic diversity within volcanic archipelagos: The case of the widespread endemic *Canarina canariensis* (Campanulaceae). *Molecular Ecology*, 24(15), 3944-3963.
<https://doi.org/10.1111/mec.13282>
- Martínez-Tillería, K., León-Lobos, P., & Poulin, E. (2018). *Diversidad Genética* (pp. 59-69).
- Matschiner, M. (2016). Fitchi: Haplotype genealogy graphs based on the Fitch algorithm. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(8), 1250-1252.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv717>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods

- for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Ortiz, E. M. (2019). vcf2phylip v2. 0: Convert a VCF matrix into several matrix formats for phylogenetic analysis. URL <https://doi.org/105281/zenodo,2540861>. <https://scholar.google.com/scholar?cluster=11956355258399499951&hl=en&oi=scholar>
- Paradis, E., & Schliep, K. (2019). ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526-528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>
- Paris, J. R., Stevens, J. R., & Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: A road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1360-1373. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12775>
- Parque Nacional Galápagos. (s. f.). *¿Dónde nos encontramos?* Recuperado 14 de mayo de 2024, de <https://galapagos.gob.ec/donde-nos-encontramos/>
- Phillips, R. B., Wiedenfeld, D. A., & Snell, H. L. (2012). Current status of alien vertebrates in the Galápagos Islands: Invasion history, distribution, and potential impacts. *Biological Invasions*, 14(2), 461-480. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-0090-z>
- Queirós, J., Godinho, R., Lopes, S., Gortazar, C., de la Fuente, J., & Alves, P. C. (2015). Effect of microsatellite selection on individual and population genetic inferences: An empirical study using cross-specific and species-specific amplifications. *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 747-760. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12349>

- Rimieri, P. (2017). *La diversidad genética y la variabilidad genética: Dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal*. 28(2), 7-14.
- Rivera-Colón, A. G., & Catchen, J. (2022). Population Genomics Analysis with RAD, Reprised: Stacks 2. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2498, 99-149.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2313-8_7
- Shen, C.-H. (2023). Chapter 13—Genome and transcriptome analysis. En C.-H. Shen (Ed.), *Diagnostic Molecular Biology (Second Edition)* (pp. 367-391). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91788-9.00012-0>
- Thavornkanlapachai, R., Mills, H., Ottewell, K., Friend, J., & Kennington, W. (2021). Temporal Variation in the Genetic Composition of an Endangered Marsupial Reflects Reintroduction History. *Diversity*, 13, 257. <https://doi.org/10.3390/d13060257>
- The IUCN Red List of Threatened Species*. (s. f.). IUCN Red List of Threatened Species. Recuperado 16 de abril de 2024, de <https://www.iucnredlist.org/es>
- Thermo Scientific. (2019). *260/280 and 260/230 Ratios*. https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf
- Toda, M., Hikida, T., Okada, S., & Ota, H. (2003). Contrasting patterns of genetic variation in the two sympatric geckos *Gekko tawaensis* and *G. japonicus* (Reptilia: Squamata) from western Japan, as revealed by allozyme analyses. *Heredity*, 90(1), 90-97.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800183>
- Torres-Carvajal, O., Barnes, C. W., Pozo-Andrade, M. J., Tapia, W., & Nicholls, G. (2014). Older than the islands: Origin and diversification of Galápagos leaf-toed geckos (Phyllodactylidae: *Phyllodactylus*) by multiple colonizations. *Journal of Biogeography*, 41(10), 1883-1894. <https://doi.org/10.1111/jbi.12375>
- Torres-Carvajal, O., Rodríguez-Guerra, A., & Chaves, J. A. (2016). Present diversity of Galápagos leaf-toed geckos (Phyllodactylidae: *Phyllodactylus*) stems from three

- independent colonization events. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 103, 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.07.006>
- Towns, D. R., Daugherty, C. H., & Cree, A. (2001). Raising the prospects for a forgotten fauna: A review of 10 years of conservation effort for New Zealand reptiles. *Biological Conservation*, 99(1), 3-16. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00184-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00184-1)
- Uetz, P., Slavenko, A., Meiri, S., & Heinicke, M. (2020). Gecko diversity: A history of global discovery. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 66, 1-9.
<https://doi.org/10.1163/22244662-bja10003>
- UNESCO. (s. f.). *Islas Galápagos*. UNESCO World Heritage Centre. Recuperado 14 de mayo de 2024, de <https://whc.unesco.org/es/list/1>
- University of Wyoming. (s. f.). *Population Genetics Glossary*. Population Genetics Glossary. Recuperado 15 de abril de 2024, de <https://www.uwyo.edu/dbmcd/popecol/maylects/popgengloss.html>
- Vázquez Rojas, K. A. (2018). *Estructura genética mediante SNPs en bancos de almeja generosa (Panopea globosa; Dall 1898) del Alto Golfo de California* [masterThesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.].
<http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1742>
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J., Tapia-Olivares, B. L., López-Upton, J., Santacruz-Varela, A., & Beaulieu, J. (2014). COMPARACIÓN DE QST vs. FST EN POBLACIONES NATURALES DE *Pinus hartwegii* LINDL. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(2), 117. <https://doi.org/10.35196/rfm.2014.2.117>
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE. *Evolution; International Journal of*

Organic Evolution, 38(6), 1358-1370. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x>

Werner, R., & Hoernle, K. (2003). New volcanological and volatile data provide strong support for the continuous existence of Galápagos Islands over the past 17 million years. *International Journal of Earth Sciences*, 92(6), 904-911. <https://doi.org/10.1007/s00531-003-0362-7>

Williams, R. J., Horrocks, J. A., & Pernetta, A. P. (2020). Habitat use by an endemic and a non-native gecko: Natural habitat provides a last refuge for the Barbados Leaf-Toed gecko. *Neotropical Biodiversity*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23766808.2020.1804750>

Willing, E.-M., Dreyer, C., & Oosterhout, C. van. (2012). Estimates of Genetic Differentiation Measured by FST Do Not Necessarily Require Large Sample Sizes When Using Many SNP Markers. *PLOS ONE*, 7(8), e42649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042649>

Zeggini, E., & Ioannidis, J. P. A. (2009). Meta-analysis in genome-wide association studies. *Pharmacogenomics*, 10(2), 191-201. <https://doi.org/10.2217/14622416.10.2.191>

Zimmerman, S. J., Aldridge, C. L., & Oyler-McCance, S. J. (2020). An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern. *BMC Genomics*, 21(1), 382. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06783-9>

ZYMO. (2021, noviembre 24). *What are Phred Scores?* Zymo Research International. <https://zymoresearch.eu/blogs/blog/what-are-phred-scores>

9. ANEXOS

ANEXO 1: INFORMACIÓN SOBRE LOS INDIVIDUOS MUESTREADOS EN ESTE ESTUDIO EN LAS ISLAS GALÁPAGOS (LABORATORIO DE ZOOLOGÍA TERRESTRE, 2023).

ID	Especie	Concentración de ADN ng/μl	Índice de calidad 260/280	Índice de calidad 260/230	Lugar de muestreo
4078	<i>Phyllodactylus andysabini</i>	16.4	1,9	2,65	Volcán Wolf, Isabela
4079	<i>Phyllodactylus andysabini</i>	23	1,86	2,37	Volcán Wolf, Isabela
3993	<i>Phyllodactylus baurii</i>	25.8	1,88	2,1	Floreana Oeste
3994	<i>Phyllodactylus baurii</i>	24.4	1,9	2,41	Floreana Oeste
3995	<i>Phyllodactylus baurii</i>	22.2	1,92	2,47	Floreana Oeste
3997	<i>Phyllodactylus baurii</i>	14.98	1,86	1,93	Floreana Oeste
3998	<i>Phyllodactylus baurii</i>	22.8	1,93	3,15	Floreana Oeste
4012	<i>Phyllodactylus baurii</i>	23.6	1,84	1,61	Floreana Norte
4013	<i>Phyllodactylus baurii</i>	22.4	1,84	1,62	Floreana Norte
4014	<i>Phyllodactylus baurii</i>	23.2	1,81	1,49	Floreana Norte
4015	<i>Phyllodactylus baurii</i>	21.4	1,83	1,68	Floreana Norte
4017	<i>Phyllodactylus baurii</i>	20.6	1,85	1,94	Floreana Norte
4018	<i>Phyllodactylus baurii</i>	22.8	1,88	1,3	Floreana Norte
4019	<i>Phyllodactylus baurii</i>	24	1,77	1,67	Floreana Norte
4024	<i>Phyllodactylus baurii</i>	20.6	1,78	1,17	Floreana Este
4027	<i>Phyllodactylus baurii</i>	19.54	1,81	1,52	Floreana Este
4028	<i>Phyllodactylus baurii</i>	19.42	1,84	1,38	Floreana Este
4029	<i>Phyllodactylus baurii</i>	18.94	1,89	1,47	Floreana Este
4031	<i>Phyllodactylus baurii</i>	17.2	1,9	2,19	Floreana Este
4119	<i>Phyllodactylus darwini</i>	21.2	1,83	2,4	Playa Baquerizo, San Cristóbal
4121	<i>Phyllodactylus darwini</i>	16.6	1,83	2,22	Playa Baquerizo, San Cristóbal
4140*	<i>Phyllodactylus darwini</i>	8.92	3,42	0,3	Bahía Sardina, San Cristóbal
4146	<i>Phyllodactylus darwini</i>	15.1	1,95	2,17	Tijeretas, San Cristóbal
4150	<i>Phyllodactylus darwini</i>	25	1,97	1,73	Tijeretas, San Cristóbal
4160	<i>Phyllodactylus darwini</i>	15.4	1,89	2,31	Jardín de Opuntias, San Cristóbal
4211	<i>Phyllodactylus darwini</i>	18	1,92	1,97	Puerto Chino, San Cristóbal

4214	<i>Phyllodactylus darwini</i>	21	1,88	2,41	Puerto Chino, San Cristóbal
4215	<i>Phyllodactylus darwini</i>	17.8	1,9	2,68	Puerto Chino, San Cristóbal
4219	<i>Phyllodactylus darwini</i>	14.8	1,88	2,36	Puerto Chino, San Cristóbal
4220	<i>Phyllodactylus darwini</i>	23.4	1,87	2,38	Puerto Chino, San Cristóbal
4221	<i>Phyllodactylus darwini</i>	15.5	1,88	2,38	Puerto Chino, San Cristóbal
4222	<i>Phyllodactylus darwini</i>	18.3	1,91	2,54	Puerto Chino, San Cristóbal
4247	<i>Phyllodactylus darwini</i>	15.1	2,01	3,88	Lobería, San Cristóbal
4248	<i>Phyllodactylus darwini</i>	16.3	1,98	2,87	Lobería, San Cristóbal
4249	<i>Phyllodactylus darwini</i>	15.1	2,06	3,75	Lobería, San Cristóbal
3961*	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	12.4	1,91	3,12	Playa Garrapatero, Santa Cruz
3971	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	16.2	2,11	4,15	Bahía Tortuga, Santa Cruz
3972	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	18.6	1,9	2,3	Bahía Tortuga, Santa Cruz
3977	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	11.6	1,89	2,12	Playa Garrapatero, Santa Cruz
3982	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	15.2	1,9	1,66	Playa Garrapatero, Santa Cruz
3983	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	16.5	1,97	2,26	Playa Garrapatero, Santa Cruz
3984	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	13.3	1,87	2,62	Playa Garrapatero, Santa Cruz
3988	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	16.4	1,91	2,16	Playa Garrapatero, Santa Cruz
4032	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	25.2	1,86	2,28	Playa Roja, Santa Cruz
4033	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	15.7	1,91	2,14	Bahía Tortuga, Santa Cruz
4037	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	17.4	1,98	1,53	Bahía Tortuga, Santa Cruz
4038	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	15.5	1,9	2,21	Bahía Tortuga, Santa Cruz
4039	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	19.5	1,91	2,07	Bahía Tortuga, Santa Cruz
4043	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	17	1,83	2,52	Playa Roja, Santa Cruz
4044	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	19.8	1,84	1,75	Playa Roja, Santa Cruz
4045	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	19.8	1,9	2,21	Playa Roja, Santa Cruz
4046	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	23.6	1,92	1,88	Playa Roja, Santa Cruz

4047	<i>Phyllodactylus galapagensis</i>	15.4	1,85	2,44	Playa Roja, Santa Cruz
4115	<i>Phyllodactylus leei</i>	15.5	1,87	1,34	Playa Baquerizo, San Cristóbal
4124	<i>Phyllodactylus leei</i>	17.2	1,86	1,98	Playa Baquerizo, San Cristóbal
4127	<i>Phyllodactylus leei</i>	24	1,89	2,72	Punta Pitt, San Cristóbal
4128	<i>Phyllodactylus leei</i>	21.2	1,88	1,68	Punta Pitt, San Cristóbal
4131	<i>Phyllodactylus leei</i>	16.6	1,9	2,44	Punta Pitt, San Cristóbal
4133	<i>Phyllodactylus leei</i>	23.2	1,88	2,4	Punta Pitt, San Cristóbal
4138	<i>Phyllodactylus leei</i>	23	1,94	2,81	Bahía Sardina, San Cristóbal
4139	<i>Phyllodactylus leei</i>	22.8	1,88	2,11	Bahía Sardina, San Cristóbal
4145	<i>Phyllodactylus leei</i>	20	1,83	2,36	Tijeretas, San Cristóbal
4152	<i>Phyllodactylus leei</i>	16.4	1,84	2,15	Tijeretas, San Cristóbal
4164	<i>Phyllodactylus leei</i>	19.4	1,86	1,97	Jardín de Opuntias, San Cristóbal
4212	<i>Phyllodactylus leei</i>	15.7	1,95	2,09	Puerto Chino, San Cristóbal
4226	<i>Phyllodactylus leei</i>	14	1,84	1,32	Puerto Chino, San Cristóbal
4236	<i>Phyllodactylus leei</i>	15.1	1,8	0,36	Lobería, San Cristóbal
4238	<i>Phyllodactylus leei</i>	15.1	1,93	2,38	Lobería, San Cristóbal
4054	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	15.6	1,89	1,47	Puerto Villamil, Isabela
4056	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	17.6	1,9	2,19	Puerto Villamil, Isabela
4057	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	17.8	1,87	1	Puerto Villamil, Isabela
4059	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	24.6	1,93	1,82	Puerto Villamil, Isabela
4061	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	16.9	1,86	2,08	Puerto Villamil, Isabela
4068	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	19.5	1,9	2,65	Volcán Alcedo, Isabela
4072	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	16.3	1,91	2,14	Volcán Alcedo, Isabela
4073	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	15	1,98	1,53	Volcán Alcedo, Isabela
4074	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	15.2	1,9	2,21	Volcán Alcedo, Isabela

4075	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	19.2	1,91	2,07	Volcán Alcedo, Isabela
4077	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	18.5	1,85	2,65	Volcán Alcedo, Isabela
4080	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	24	1,91	3,02	Punta Espinoza, Fernandina
4081	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	19.96	2,11	4,15	Punta Espinoza, Fernandina
4084	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	22.2	1,9	2,3	Punta Espinoza, Fernandina
4086	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	24.6	1,89	2,12	Punta Espinoza, Fernandina
4087	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	25	1,9	1,66	Punta Espinoza, Fernandina
4089	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	24	1,97	2,26	Punta Espinoza, Fernandina
4092	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	18	1,82	1,64	Volcán Darwin, Isabela
4093	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	16.2	1,86	2,65	Volcán Darwin, Isabela
4094	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	16.1	1,85	2,54	Volcán Darwin, Isabela
4095	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	19.9	1,79	1,25	Volcán Darwin, Isabela
4100	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	19.6	1,82	1,85	Cerro Azul, Isabela
4101	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	14.3	1,81	1,59	Cerro Azul, Isabela
4102	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	17.9	1,83	1,91	Cerro Azul, Isabela
4103	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	20.2	1,82	1,57	Cerro Azul, Isabela
4105	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	15.1	1,8	1,46	Cerro Azul, Isabela
4106	<i>Phyllodactylus simpsoni</i>	16.3	1,87	2,09	Cerro Azul, Isabela

*Muestras eliminadas de los análisis con VCFtools v.0.1.5