

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Posgrados**

**“Genética poblacional de la lagartija de lava endémica  
(*Microlophus bivittatus*) de la Isla San Cristóbal e islote Lobos,  
Galápagos-Ecuador, mediante microsatélites: Como parte de la  
línea base para su manejo y conservación”**

**Ana María Troya Zuleta**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Magister  
en Ecología con mención en Ecología Tropical y Manejo de Recursos Naturales.

Quito, mayo del 2012

**Universidad San Francisco de Quito**

**Colegio de Postgrados**

**HOJA DE APROBACION DE TESIS**

**“Genética poblacional de la lagartija de lava endémica  
(*Microlophus bivittatus*) de la isla San Cristóbal e islote Lobos,  
Galápagos-Ecuador, mediante microsatélites: Como parte de la  
línea base para su manejo y conservación”**

**Ana María Troya Zuleta**

Carlos A. Valle, Ph.D.

Director de la Tesis

-----

Omar Torres, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

-----

Stella de la Torre, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

-----

Esteban Suárez, Ph.D.

Director de la Maestría en Ecología

-----

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias  
Biológicas y Ambientales

-----

Víctor Viteri Breedy, Ph.D.

Decano del Colegio de Postgrados

-----

**Quito, mayo de 2012**

**© Derechos de autor**  
**Ana María Troya Zuleta**  
**2012**

**A los que creyeron, en especial mi madre**

## AGRADECIMIENTOS

A Carlos Valle, Ph.D. y Omar Torres, Ph.D. por su gran paciencia, apoyo constante e incondicional, y la valiosa guía durante la realización de esta disertación.

Al Instituto Académico Galápagos para las Artes y las Ciencias (GAIAS-USFQ) por su financiamiento como parte del proyecto “Diversidad Genética, estructura poblacional y evaluación del impacto de los gatos domésticos y ferales en la población, comportamiento y ecología de la lagartija de lava de San Cristóbal (*Microlophus bivittatus*)” de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ).

A Rommel Montúfar, Ph.D., director del laboratorio de Genética Molecular (113) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por su apoyo constante e incondicional y su inmensa colaboración, así como por su invaluable ayuda, sus consejos y enseñanzas, su gran paciencia y apoyo.

A Paola Carrión por su ayuda en el campo y colección de muestras.

A mi familia: Mónica y Miguel; Mario y Gladis; Mario, Tata, Ariel y Martín; y Jimmy por su comprensión y su cariño siempre solidario.

A mis amigos Cristina Narváez, Alexandra Narváez, Paola Carrera, Ailín Blasco, Juan Carlos Escobar, Carolina Proaño, Oscar Pérez, Margarita Baquero, Pablo Cabrera, Mario Yáñez, Teresa Camacho, Natalia Sáenz, Nadia López, Anita Villacis y César Yumiseva, por su cariño y amistad incondicional en estos y muchos otros momentos.

Un agradecimiento gigante a mi madre y abuelo por nunca haber dudado.....

## RESUMEN

La comprensión sobre una especie animal, envuelve tanto el estudio de las implicaciones ecológicas y evolutivas de las estrategias de comportamiento de los animales, como también el estado de las poblaciones (niveles de endogamia, flujo génico, entre otros). La utilización de marcadores moleculares ayuda a comprender la dinámica de las poblaciones como también la historia natural de las mismas, permitiendo así la identificación de problemas y el diseño de planes de manejo más acertados, tanto *in situ* como *ex situ* para especies amenazadas o no.

En este estudio se analizó la diversidad genética y la estructura poblacional en seis localidades de *Microlophus bivittatus* de la isla San Cristóbal. La heterocigosidad observada (0.530 - 0.698) y la diversidad alélica (6.67 - 7.50) fueron moderados en todas las localidades. Al correlacionar la diferenciación genética entre individuos con las distancias geográficas, el valor obtenido para  $R_{xy}$  fue 0.18 con una significancia de  $P_{\text{MANTEL}} = 0.0001$ . La diferenciación genética entre localidades fue baja ( $F_{\text{STGLOBAL}} = 0.031$ ,  $P = 0.001$ ) a nivel global. Para la comparación entre localidades se utilizaron 3 índices de diferenciación ( $F_{\text{ST}} = 0.21 - 0.15$ ;  $G'_{\text{ST}} = 0.089 - 0.480$ ;  $D = 0.019 - 0.174$ ), no se observó ninguna estructuración, lo cual puede ser explicado ya que la variación entre localidades es del 6 %, mientras la variación dentro de las localidades es del 87 %. Al analizar la variación entre regiones “norte - sur” y “este - oeste”, se observó que en la agrupación “norte - sur” la variación se explica: entre regiones 1 %, entre localidades 2 %, dentro de las localidades 32 % y entre individuos el 64 %. Mientras que en la agrupación “este - oeste” la variación se encuentra: entre regiones 0 %, el 11 % entre localidades, el 16 % entre individuos y el 73 % dentro de los individuos. Los valores  $F_{\text{IS}}$  variaron entre 0.066 y 0.277 y los valores de  $N_m$  se encuentra entre 1.32 y 12.88. Esto puede ser debido a que esta especie presenta una distribución continua a lo largo de la isla, y que el número de migrantes entre la misma es alta contribuyendo así a la hipótesis de que presentan un modelo de migración paso a paso circular (Stepping-Stone Model).

**Palabras clave:** Diferenciación Genética, Diversidad Genética, Flujo Génico, Galápagos, Microsatélites, *Microlophus bivittatus*, Stepping-Stone Model (SSM).

## ABSTRACT

The understanding of an animal species, involves both the study of ecological and evolutionary implications of the strategies of animal behavior, as well as the status of stocks (levels of inbreeding, gene flow, etc.). The use of molecular markers to help understand the dynamics of populations as well as the natural history of the same, allowing the identification of problems and design of management plans more successful, both in situ and ex situ for threatened species or not.

This study analyzed the genetic diversity and population structure in six locations in *Microlophus bivittatus* of San Cristobal Island. The observed heterozygosity (0.530-0.698) and allelic diversity (6.67 - 7.50) were moderate in all locations. By correlating the genetic differentiation between individuals with geographical distances, the value for  $R_{xy}$  was 0.18 with a significance of  $P_{MANTEL} = 0.0001$ . Genetic differentiation among sites was low ( $F_{STGLOBAL} = 0.031$ ,  $P = 0.001$ ) globally. For comparison between locations were used 3 indices of differentiation ( $F_{ST} = 0.21$  to  $0.15$ ;  $G'_{ST} = 0,089$  to  $0,480$ ,  $D = 0,019$  to  $0,174$ ), there was no structure, which can be explained as the variation between locations is 6%, while variation within localities is 87%. By analyzing the variation between regions "north - south" and "East - West", was observed in the group "North - South" explained variation: between regions 1%, 2% between locations within the towns 32% and 64% among individuals. While in the group "East - West" is variation: between regions 0%, 11% among sites, 16% among individuals and 73% within individuals.  $F_{IS}$  values varied between 0.066 and 0.277,  $Nm$  values and are located between 1.32 and 12.88. This may be because this species has a continuous distribution throughout the island, and the number of migrants between the same is high thus contributing to the hypothesis that migration presents a model step by step circular (Stepping-Stone Model).

**Key words:** Genetic Differentiation, Genetic Diversity, Gene Flow, Galápagos, Microsatellites, *Microlophus bivittatus*, Stepping-Stone Model (SSM).

## TABLA DE CONTENIDOS

### CAPÍTULO I

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. <b>ANTECEDENTES</b> .....	1
1.2. <b>EL GÉNERO <i>Microlophus</i> DUMÈRIL &amp; BIBRON (SQUAMATA: TROPIDURIDAE)</b> .....	2
1.2.1. El género <i>Microlophus</i> en las Islas Galápagos .....	3
1.2.2. <i>Microlophus bivittatus</i> .....	3
1.3. <b>ECOLOGÍA MOLECULAR</b> .....	4
1.3.1. Diversidad Genética y formas de medirla .....	7
1.3.2. Genética de la Conservación .....	9
1.3.3. Marcadores Moleculares .....	12
1.3.3.1. Generalidades .....	12
1.3.3.2. Aplicaciones .....	13
1.3.3.3. Microsatélites o SSR (Short Sequences Repeats) .....	13
1.4. <b>PREGUNTAS O PROBLEMAS CIENTÍFICOS</b> .....	15
1.4.1. ¿Cuál es el nivel de diversidad y divergencia genética de la lagartija de lava de San Cristóbal ( <i>Microlophus bivittatus</i> ) alrededor de la isla?	15
1.5. <b>HIPÓTESIS</b> .....	16
1.6. <b>OBJETIVOS</b> .....	16
1.6.1. Objetivo General .....	16
1.6.2. Objetivos Específicos .....	17
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	18

### CAPÍTULO II

#### DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURAMIENTO POBLACIONAL DE LA LAGARTIJA DE LAVA (*Microlophus bivittatus*) DE LA ISLA SAN CRISTÓBAL, GALÁPAGOS – ECUADOR

1. <b>RESUMEN</b> .....	26
2. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	27
3. <b>METODOLOGÍA</b> .....	29
3.1. <b>ÁREA DE ESTUDIO, COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS</b>	29



3.2.	DETECCIÓN DE LA VARIACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES .....	31
3.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	33
3.3.1.	Desequilibrio Ligado .....	33
3.3.2.	Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) .....	33
3.3.3.	Diversidad genética .....	34
3.3.4.	Diferenciación genética .....	35
3.3.5.	Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA).....	38
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1.	OBTENCIÓN DE ADN Y DE DATOS .....	38
4.2.	DESEQUILIBRIO LIGADO Y EQUILIBRIO HARDY – WEINBERG .....	39
4.3.	DIVERSIDAD GENÉTICA .....	41
4.4.	DIFERENCIACIÓN GENÉTICA .....	43
4.4.1.	Entre individuos .....	43
4.4.2.	Entre Localidades .....	43
4.4.3.	Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) .....	46
5.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	47
5.1.	DESEQUILIBRIO LIGADO Y EQUILIBRIO HARDY – WEINBERG .....	47
5.2.	DIVERSIDAD GENÉTICA .....	48
5.3.	DIFERENCIACIÓN GENÉTICA .....	49
	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Mapa de las localidades analizadas en la Isla San Cristóbal e Islote Lobos.....	59
<b>Figura 2.</b>	Patrones alélicos a través de las localidades analizadas.....	60
<b>Figura 3.</b>	Análisis de agrupamiento “Neighbor Joinig” utilizando la distancia “simple matching” (bootstrap 1000).....	61
<b>Figura 4.</b>	Prueba de Mantel entre las distancias geográficas y la distancia “Allele Sharing” de los individuos ( $R_{xy} = - 0.284$ ).....	62
<b>Figura 5.</b>	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de $F_{ST}$ (Weir & Cockerham 1984) por pares de localidades.....	62
<b>Figura 6.</b>	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de $G'_{ST}$ (Hedrick 2005) por pares de localidades.....	63
<b>Figura 7.</b>	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de $D$ (Jost 2009) por pares de localidades.....	63
<b>Figura 8.</b>	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de Nei (1972).....	64
<b>Figura 9.</b>	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de Slatkin (1985).....	64
<b>Figura 10.</b>	Test de Mantel entre el índice $F_{ST}$ (Weir & Cockerham 1984) y distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = - 0.253$ ).....	65
<b>Figura 11.</b>	Test de Mantel entre el índice $G'_{ST}$ (Hedrick 2005) y distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = - 0.191$ ).....	65

<b>Figura 12.</b>	Test de Mantel entre el índice $D$ (Jost 2009) y las distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = -0.171$ ).....	66
<b>Figura 13.</b>	Test de Mantel entre la distancia genética de Nei (1972) y las distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = -0.245$ ).....	66
<b>Figura 14.</b>	Test de Mantel entre la distancia genética de Slatkin (1985) y las distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = -0.211$ ).....	67
<b>Figura 15.</b>	Porcentajes de la variación de <i>M. bivittatus</i> en la Isla San Cristóbal explicado en el AMOVA. A: grupos “norte - PBM - sur”; B: grupo “este - oeste - PBM”.....	68

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Número de alelos y número de alelos únicos muestreados por locus y población, obtenido con los programas Fstat y GenAEx.	70
<b>Tabla 2.</b>	Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) por locus y población, obtenido con los programas Arlequin, Fstat y GenAEx.....	71
<b>Tabla 3.</b>	Diversidad génica (Nei 1987) por locus y población, obtenido con los programas Fstat y Arlequin.....	72
<b>Tabla 4.</b>	Riqueza alélica por locus y población en función del tamaño mínimo de muestra de: 28 individuos diploides, obtenido con el programa Fstat.....	73
<b>Tabla 5.</b>	Valores obtenidos para el índice de Garza-Williamson (2001), obtenido con el programa Arlequin.....	74
<b>Tabla 6.</b>	Valores obtenidos para el coeficiente de endogamia - consanguinidad ( $F_{IS}$ ) de las localidades de <i>M. bivittatus</i> calculado en los programas Arlequin y GenePop.....	75
<b>Tabla 7.</b>	Índices de diferenciación genética $F_{ST}$ (Weir and Cockerham 1984) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa Arlequin.....	76
<b>Tabla 8.</b>	Índices de diferenciación genética $G'_{ST}$ (Hedrick 2005) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa SMOGD.....	76

<b>Tabla 9.</b>	Índices de diferenciación genética $D$ (Jost 2009) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa SMOGD.....	77
<b>Tabla 10.</b>	Distancia genética de Nei (1972) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa GenAlEx.....	77
<b>Tabla 11.</b>	Distancia genética de Slatkin (1985) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa Arlequin.....	78
<b>Tabla 12.</b>	Distancias geográficas (km) entre las seis localidades analizadas.....	78
<b>Tabla 13.</b>	AMOVA de las localidades de <i>M. bivittatus</i> (grupos: norte - PBM - sur) calculado en el programa Arlequin.....	79
<b>Tabla 14.</b>	AMOVA de las localidades de <i>M. bivittatus</i> (grupos: este - oeste) calculado en el programa Arlequin.....	79
<b>Tabla 15.</b>	Índice $F_{IS}$ específicos para cada localidad (1023 permutaciones), calculado en el programa Arlequin.....	80
<b>Tabla 16.</b>	Valores de $Nm$ entre localidades de <i>M. bivittatus</i> calculado en el programa Arlequin.....	80

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b>	Información tomada en el campo (edad, sexo y coordenadas geográficas) de los individuos utilizados en este estudio.....	81
<b>Anexo 2.</b>	Protocolo propuesto por el fabricante para cola de ratón – Technical Manual (p. 12).....	84
<b>Anexo 3.</b>	Microsatélites diseñados para las especies del género <i>Microlophus</i> (Jordan et al. 2002).....	85
<b>Anexo 4.</b>	Valores obtenidos de concentración y pureza de las muestras de ADN de <i>Microlophus bivittatus</i> .....	86
<b>Anexo 5.</b>	Frecuencias alélicas de cada loci dentro de cada localidad analizadas, Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).....	89
<b>Anexo 6.</b>	Pares de loci ligados en cada población, obtenidos con el programa GenePop.....	90
<b>Anexo 7.</b>	Valores de $P$ obtenidos en el análisis de desequilibrio ligado en cada par de locus a través de todas las localidades (método Fisher), obtenidos con el programa GenePop.....	92
<b>Anexo 8.</b>	Análisis global (test de Fisher) del equilibrio Hardy-Weinberg por localidades, obtenidos con el programa GenePop.....	94
<b>Anexo 9.</b>	Análisis global (test de Fisher) del equilibrio Hardy-Weinberg por locus, obtenidos con el programa GenePop.....	94
<b>Anexo 10.</b>	Análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando la distancia “simple matching”.....	95

<b>Anexo 11.</b> Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) en tres dimensiones realizado en los individuos de las cinco localidades.....	96
--	----

# CAPÍTULO I.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

Las Islas Galápagos son un archipiélago de islas volcánicas geológicamente jóvenes (CHRISTIE *et al.* 1992), distribuidas alrededor de la línea ecuatorial en el Océano Pacífico oriental, a 973 Km del Ecuador continental. Galápagos tiene islas tanto al norte como al sur de la línea ecuatorial (Latitud entre 1° 40' N y 1° 36' S; Longitud 89° 16' W y 92° 01' W) (SNELL *et al.* 1996). Son famosas por su gran número de especies endémicas, además de haber contribuido en el desarrollo de la teoría de la Evolución de Darwin por selección natural (PARENT *et al.* 2008).

Este Archipiélago ha brindado oportunidades para una rápida colonización y especiación, y tiene un registro geológico que puede ser utilizado para estimar la cronología de los eventos evolutivos (BENAVIDES *et al.* 2009; EMERSON 2002). Estudios moleculares de las radiaciones en las Galápagos generalmente han sido basados en métodos filogenéticos que no tienen el poder de discriminar entre diversos factores evolutivos, los que pueden causar asociaciones entre la variación genética y geográfica, tales como el rango de expansión, la fragmentación en el pasado, y el flujo de genes (BEHEREGARAY *et al.* 2004).

Para las Galápagos los estudios moleculares han detectado conflictos en las relaciones entre la diversificación de la población y la formación de especies a causa del contacto secundario entre estas, es el caso de los pinzones de Darwin (GRANT and GRANT 2002; GRANT *et al.* 1996), el caso de las iguanas marinas y el sesgo de dispersión parcial por sexo (RASSMANN *et al.* 1997), o múltiples colonizaciones desde el continente, como es el caso de las lagartijas de lava



(BENAVIDES *et al.* 2007; BENAVIDES *et al.* 2009; KIZIRIAN *et al.* 2004). Aunque la filogenia de la mayoría de los grupos de especies de vertebrados de Galápagos ha sido relativamente bien estudiada, el conocimiento sobre la historia de microprocesos evolutivos y su efecto en las poblaciones insulares aún es limitado (BEHEREGARAY *et al.* 2003; CIOFI *et al.* 2006; JORDAN and SNELL 2008).

## **1.2. EL GÉNERO *Microlophus* DUMÉRIL & BIBRON (SQUAMATA: TROPIDURIDAE)**

Las lagartijas de lava (Género *Microlophus*, Duméril and Bibron 1837) se encuentran distribuidas a lo largo de la costa occidental de Sur América y en las Islas Galápagos. Existe evidencia filogenética de su condición monofilética, y de la ocurrencia de dos clados al interior del género (“occipitalis” y “peruvianus”), los cuales son claramente diagnosticables por sinapomorfías referidas a escamación, pliegues corporales (DIXON and WRIGHT 1975), caracteres osteológicos (FROST 1992) y datos moleculares (ADN mitocondrial y ADN nuclear) (BENAVIDES *et al.* 2007; BENAVIDES *et al.* 2009; FROST *et al.* 2001; KIZIRIAN *et al.* 2004).

*Microlophus* está representado por 21 especies en total, de las cuales nueve son endémicas de Galápagos (JORDAN and SNELL 2008; JORDAN *et al.* 2005; KIZIRIAN *et al.* 2004).

### 1.2.1. El género *Microlophus* en las Islas Galápagos

Para explicar la diversidad del género *Microlophus* en Galápagos, se han realizado tanto estudios morfológicos (WRIGHT 1983; WRIGHT 1984) y moleculares (BENAVIDES *et al.* 2007; BENAVIDES *et al.* 2009; JORDAN *et al.* 2002; JORDAN and SNELL 2008; KIZIRIAN *et al.* 2004; LOPEZ *et al.* 1992) que nos revelan que las especies endémicas de las Islas Galápagos han evolucionado de dos colonizaciones por parte del grupo “occipitalis” desde la costa occidental de Sur América. De la primera colonización evolucionan las especies del “clado I - Galápagos Oriental”, el cual se compone de *M. habeli* (Isla Marchena) y de *M. bivittatus* (Isla San Cristóbal), y de la segunda colonización evolucionan el “clado II - Galápagos Occidental”, compuesto por *M. delanonis* (Isla Española), y el complejo albemarensis compuesto a su vez de *M. duncanensis* (Isla Duncan), *M. indefatigabilis* (Islas Santa Cruz y Santa Fe), *M. jacobi* (Isla Santiago), *M. grayii* (Isla Floreana), *M. albemarensis* (Islas Isabela y Fernandina) y *M. pacificus* (Isla Pinta) (BENAVIDES *et al.* 2007; BENAVIDES *et al.* 2009; KIZIRIAN *et al.* 2004; WRIGHT 1983; WRIGHT 1984).

### 1.2.2. *Microlophus bivittatus*

*Microlophus bivittatus* Peters 1871 fue originada en la primera colonización, es endémica de la Isla San Cristóbal (BENAVIDES *et al.* 2009; KIZIRIAN *et al.* 2004). Esta especie, al igual que las otras especies de Galápagos, presenta una distribución en anillo (SNELL *et al.* 1988; SNELL *et al.* 1996), es decir se encuentra a lo largo de las zonas del litoral y seca baja de las islas grandes, escasamente

llegan a la zona de transición y casi nunca están en la zona alta. Los individuos de esta especie presentan dimorfismo sexual, los machos presentan dos bandas de color blanco a cada lado del cuerpo, mientras que las hembras presentan en la parte ventral-frontal una coloración naranja. Viven en harems, un macho con muchas hembras, son territoriales en aproximadamente un área de 5-10m<sup>2</sup> (BREMNER and PÉREZ 2002; PÉREZ and BALTA 2007; QUISPITÚPAC and PÉREZ 2009). Su estado es vulnerable (libro rojo del Ecuador), su amenaza en la actualidad son los gatos domésticos y ferales (CDF and WWF 2002).

### **1.3. ECOLOGÍA MOLECULAR**

La comprensión sobre una especie animal, envuelve tanto el estudio de las implicaciones ecológicas y evolutivas de las estrategias de comportamiento de los animales, como también el estado de las poblaciones (niveles de endogamia, flujo génico, entre otros). La utilización de marcadores moleculares ayuda a comprender la dinámica de las poblaciones como también la historia natural de las mismas, permitiendo así la identificación de problemas y el diseño de planes de manejo más acertados, tanto *in situ* como *ex situ* para especies amenazadas o no (AVISE 1994; AVISE 2000; FRANKHAM *et al.* 2002).

El conocimiento de la diversidad genética y la extensión espacial de las poblaciones (distribución/dispersión) y una comprensión de las influencias entre las especies, son parte integral del manejo y conservación de las mismas (JONES *et al.* 2004). La comprensión de la estructura espacial de la población es importante para el establecimiento de la escala adecuada para la conservación y

el manejo de subunidades (BOWEN 1999; MORITZ 1994; MORITZ 1999; MORITZ 2002; PAETKAU 1999). El flujo de genes es el resultado de la combinación de múltiples desplazamientos de dispersión individuales, y el entrecruzamiento dentro de la población local por parte de los individuos inmigrantes. La estructura de la población es una función de la distancia, la magnitud de los movimientos y las barreras sobre el flujo de genes, causadas por discontinuidades en las características topográficas del paisaje y la heterogeneidad del hábitat (JONES *et al.* 2004).

El modelo de Aislamiento por distancia (WRIGHT 1943) predice que la similitud genética entre las poblaciones disminuye exponencialmente mientras que la distancia geográfica entre ellas aumenta, debido al efecto de limitación ocasionado por la distancia geográfica sobre las tasas de flujo génico. Se entiende como flujo génico al proceso de transferencia de alelos de una población a otra, o entre dos o más poblaciones, e implica la dispersión de nuevas variantes alélicas entre poblaciones diferentes. Este proceso ocasiona que las frecuencias alélicas en las poblaciones no se encuentren en equilibrio Hardy-Weinberg, entendiendo que las poblaciones que se encuentren en equilibrio son poblaciones cerradas, donde los individuos de una misma generación descienden de progenitores pertenecientes todos a la misma población. Esto casi nunca se da en poblaciones naturales (AVISE 1994; FREELAND 2005). El impacto del flujo génico en la evolución de rasgos adaptativos no es claro y ha generado gran controversia. La teoría sugiere que, en virtud de una amplia gama de condiciones, tan sólo la reproducción de un migrante por generación puede impedir la diferenciación entre las poblaciones en lugares neutrales, como consecuencia de

la deriva génica (FRANKHAM 2003; FRANKHAM *et al.* 2002; FREELAND 2005). Se entiende como deriva génica al cambio en las frecuencias alélicas, debido a que los alelos de una generación dada no constituyen una muestra representativa de las frecuencias alélicas de una generación anterior. En poblaciones naturales de tamaño finito donde se dan fluctuaciones debidas al azar, las frecuencias alélicas como genotípicas varían de generación en generación. La magnitud de las variaciones estocásticas de las frecuencias alélicas-génicas depende del tamaño poblacional. La magnitud de las variaciones esperadas de las frecuencias en los descendientes se incrementa con descensos en el tamaño de la población parental. En poblaciones naturales, relativamente grandes, los efectos de la deriva génica pueden no ser significativos en comparación con los efectos de selección o flujo génico, mientras que en poblaciones pequeñas, puede haber fluctuaciones amplias e impredecibles de las frecuencias alélicas-génicas debido a eventos aleatorios, de una generación a otra que pueden causar la extinción de las poblaciones (AVISE 1994; FRANKHAM *et al.* 2002; FREELAND 2005). Existen un gran número de estudios (BROWN *et al.* 2001; CALSBEEK and SMITH 2003; SMITH *et al.* 1997) que sugieren que una fuerte selección natural puede dar divergencia, a pesar de los altos niveles de flujo génico. Calsbeek y Smith (2003) en su estudio demostraron que los patrones de flujo génico entre las poblaciones de lagartijas del Caribe (*Anolis* spp.) se explican mejor al tener en cuenta las corrientes marinas predominantes, y que la divergencia en la aptitud relacionada con la morfología disminuye con el aumento del flujo génico. Esto confirma que el flujo génico puede homogeneizar el acervo genético (pool genético) evitando así que se de divergencia.

### 1.3.1. Diversidad Genética y formas de medirla

La diversidad genética representa pequeños cambios en las diferentes secuencias de ADN. Estos pueden resultar en modificaciones de las secuencias de aminoácidos, lo que a su vez puede traer o no cambios en la funcionalidad bioquímica o morfológica de la proteína, lo que podría verse reflejado en diferencias en la tasa de reproducción, en la tasa de supervivencia o en el comportamiento y morfología de los individuos (FRANKHAM 1998; FRANKHAM 2003; FRANKHAM 2005; FRANKHAM *et al.* 2002).

La variación genética tiene tres componentes principales:

a) **Diversidad genética**: se entiende como la cantidad de variación genética. Se puede medir en términos de: (i) Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), que corresponden a la fracción esperada de heterocigotos en una población en equilibrio Hardy – Weinberg (HWE), al comparar el valor de la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) en la población con el valor esperado ( $H_e$ ), se puede determinar si la población se encuentra en equilibrio o presenta deficiencia o exceso de heterocigotos; (ii) riqueza ( $I$ ) y diversidad alélica ( $A$ ) (el número de alelos y el promedio de alelos por locus en la población estudiada, respectivamente), estos métodos son sensibles al número de individuos muestreados; (iii) Diversidad génica ( $h$ ) (NEI 1978) se define como la probabilidad que dos haplotipos al azar sean diferentes dentro de la muestra, esta es la prueba menos sensible al tamaño de la muestra (FREELAND 2005); (iv) Rango alélico ( $R$ ), corresponde al número o proporción de loci polimórficos (loci con más de un alelo); y (v) Índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) (WRIGHT 1951), que permite inferir acerca de la diversidad en términos comparativos (FRANKHAM *et al.* 2002; FREELAND 2005).

b) **Diferenciación genética**: analiza la distribución de la variación genética entre las poblaciones. Existen varias maneras de cuantificar el grado de estructuración - diferenciación genética en un conjunto de poblaciones. Generalmente se utilizan índices que miden el nivel de flujo génico, divergencia y asociación (FREELAND 2005; HAMILTON 2009): (i) Coeficiente de endogamia ( $F_{ST}$ ) (WEIR and COCKERHAM 1984; WRIGHT 1951) nos permite cuantificar la heterocigosidad en una población, varía entre 0 (50 % homocigotos [ $p^2 = AA$  y  $q^2 = aa$ ] y 50 % heterocigotos [ $2pq = Aa$ ]) y 1 (población con 100 % de endogamia) (FREELAND 2005); (ii) Índice de diferenciación ( $D$ ), propuesto por Jost (2008), quien sostiene que índices de diferenciación como  $G_{ST}$  y sus relativos ( $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$ , y otros similares) no son válidos para calcular la diferenciación genética entre poblaciones con valores cercanos a 0, aunque estén totalmente diferenciadas; (iii) Análisis de Variancia Molecular (AMOVA) es un ANOVA anidado que permite analizar la partición de la diversidad genética en diferentes niveles jerárquicos de división poblacional. En poblaciones altamente estructuradas, el mayor porcentaje de variabilidad genética se encuentra entre las subpoblaciones, que genéticamente están muy diferenciadas, mientras que en poblaciones panmícticas la mayor variabilidad se encuentra entre los individuos dentro de las subpoblaciones, con bajo nivel de diferenciación genética entre estas últimas (FRANKHAM *et al.* 2002; FREELAND 2005; HAMILTON 2009).

c) **Distancia genética (evolutiva)**: analiza la cantidad de variación genética entre pares de poblaciones. Se puede medir en términos de: (i) Distancia genética de Nei (1972) varía entre 0 y 1 (0 = iguales, 1 = diferentes), este coeficiente de disimilitud se basa principalmente en mutación y deriva génica. Este modelo se

basa en el modelo de alelos infinitos (KIMURA and CROW 1964), donde se asume que de una población ancestral se originaron varias subpoblaciones, que divergieron por deriva génica y mutación (NEI 1972; NEI 1973; NEI 1977; NEI 1978); (ii) Distancia genética de Slatkin (1995) que considera un modelo demográfico simple donde dos poblaciones de un tamaño  $N$  divergieron en  $\tau$  generaciones desde una población de igual tamaño. Estas dos poblaciones han estado aisladas desde siempre, sin ningún intercambio de migrantes (SLATKIN 1985; SLATKIN 1987; SLATKIN 1991; SLATKIN 1995); (iii) Análisis de Coordenadas Principales (PCoA): el objetivo de este análisis es producir un gráfico de pocas dimensiones, que abarquen la mayor cantidad posible de la variación total, en donde las distancias entre los puntos dentro del plot (plano) sean lo más cercanas a la matriz original (JOLLIFFE 2002); (iv) La prueba de Mantel (1967) se utiliza con frecuencia para estimar el grado de correlación entre los valores de diferenciación (e.g.,  $F_{ST}$ ,  $D$ , y otros similares) y las distancias geográficas que separan los pares de poblaciones. Esta prueba permite examinar la hipótesis de *Aislamiento por distancia*, poblaciones más distantes entre sí tienen menor posibilidad de ser genéticamente homogéneas, ya que la probabilidad de intercambio de migrantes (flujo génico) disminuye con la distancia (HUTCHINSON and TEMPLETON 1999; JØRGENSEN *et al.* 2005; MANTEL 1967; PRIMMER *et al.* 2006; RIBEIRO *et al.* 2002)

### **1.3.2. Genética de la Conservación**

La genética de la conservación tiene como principal objetivo minimizar los riesgos de extinción debido a factores genéticos. Se entiende también como el



uso de la genética con el fin de mantener a las poblaciones y/o especies como unidades dinámicas, las cuales puedan evolucionar con el fin de lidiar con los cambios ambientales y minimizar su riesgo de extinción (FRANKHAM 2003; FRANKHAM *et al.* 2002).

Las extinciones biológicas se deben a los efectos combinados de factores determinísticos (ej. pérdida de hábitat, la sobreexplotación, especies introducidas y contaminación) y factores estocásticos (ej. demográficos, ambientales, genéticos y catástrofes) (SHAFFER 1981). Frankel (1970; 1974) fue el primero en proponer que la pérdida de la diversidad genética eleva el riesgo de extinción, principalmente por poner en peligro la respuesta adaptativa a los cambios ambientales. Frankel y Soulé (1981) incorporan los efectos nocivos de la consanguinidad al argumento, y concluyen que los factores genéticos tienen un importante papel en causar extinciones. Lande (1988; LANDE 1995) y Lynch *et al.* (1995) introducen los problemas de la acumulación de mutaciones. El cruzamiento de poblaciones que han divergido también puede causar efectos deletéreos sobre la capacidad reproductiva (depresión exogámica), pero sus efectos son menos importantes que la depresión endogámica (FRANKHAM *et al.* 2002).

Frankham (2002) reconoce once los principales usos de la genética que contribuyen a la solución de problemas en la conservación biológica:

- Los efectos nocivos de la consanguinidad en la reproducción y supervivencia (depresión endogámica).

- Pérdida de diversidad genética y la capacidad de evolucionar en respuesta a los cambios ambientales.
- Fragmentación de las poblaciones y la reducción en el flujo de genes.
- La deriva génica, que conduce a la erosión genética y pérdida de heterocigosidad especialmente de poblaciones pequeñas y aisladas.
- Acumulación de mutaciones deletéreas.
- La adaptación genética al cautiverio y sus efectos adversos en el éxito de la reintroducción.
- La resolución de incertidumbres taxonómicas.
- Definición de las unidades de gestión dentro de las especies.
- El uso de los análisis genético - moleculares en medicina forense.
- El uso de los análisis genético - moleculares para comprender aspectos de la biología de las especies importantes para la conservación
- Efectos nocivos sobre el fitness, que a veces se produce como resultado de fecundación cruzada (depresión por exogamia).

### **1.3.3. Marcadores Moleculares**

#### **1.3.3.1. Generalidades**

La biología molecular como herramienta ha brindado nuevas posibilidades de dilucidar interrogantes en los campos de la historia natural, la evolución y la biología de la conservación, aplicables a la preservación de los recursos genéticos y de los procesos evolutivos (AVISE 1994). Las técnicas moleculares ofrecen una visión complementaria (no es una alternativa) a los estudios tradicionales (AVISE 1994; AVISE 2000; DE VIENNE and SANTONI 1998; KARP *et al.* 1998; TORIBIO and CELESTINO 2000).

Se define como marcadores moleculares a las biomoléculas que se relacionan con un rasgo genético. Los primeros marcadores se desarrollaron a finales de los años 70, se basaron en la identificación de proteínas o isoenzimas. A finales de los 80's aparece la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual ha permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en ADN (GILLET 1999). Se utilizan éstos para conocer la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico (AVISE 1994; AVISE 2000; GILLET 1999; MORITZ and HILLIS 1996).

Un buen marcador molecular debe reunir las siguientes características para maximizar su utilidad: herencia codominante, ser frecuente y estar distribuido uniformemente en el genoma, comportamiento neutral, fácil y rápida accesibilidad, alto grado de polimorfismo, debe poder repetirse con fiabilidad y fácil intercambio de datos entre laboratorios (AVISE 1994; GILLET 1999; SCOTTI *et al.* 1999).

### **1.3.3.2. Aplicaciones**

Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas y cada vez se les encuentran nuevos usos. Actualmente se los utiliza en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades, biología y ecología de poblaciones, y dispersión de especies (AVISE 1994; AVISE 2000; DE VIENNE and SANTONI 1998; GILLET 1999; SCOTTI *et al.* 1999). Una serie de técnicas han sido desarrolladas para estimar la diversidad genética, pero ninguna técnica sola es universalmente ideal; cada técnica disponible presenta tanto fortalezas como debilidades (SUNNUCKS 2000).

### **1.3.3.3. Microsatélites o SSR (Short Sequences Repeats)**

Los microsatélites o SSR (por sus siglas en inglés), son secuencias o segmentos cortos de ADN de uno a seis pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma. Típicamente están conformados por un motivo repetitivo, en el cual se encuentra contenida la secuencia repetida, y dos regiones flanqueantes, las cuales se encuentran en ambos lados del motivo repetitivo. La variación en el número de repeticiones da origen a los diferentes alelos (ELLEGREN 2004; FRANKHAM *et al.* 2002; JARNE and LAGODA 1996; SCHLÖTTERER and HARR 2001; SCHÖTTERER 2004).

Para la clasificación de los microsatélites se toman en cuenta el número de repetición y el patrón de orden de los motivos repetidos. De acuerdo al número de

nucleótidos que posea el motivo de repetición: mononucleotido  $(A)_{13}$ , dinucleotidos ej.  $(GT)_8$ , trinucleotidos ej.  $(GAT)_7$ , tetranucleotidos ej.  $(TAGA)_5$ , pentanucleotidos  $(CATTG)_5$  o hexanucleótidos  $(GGATCC)_4$ . Dependiendo del patrón de orden de los motivos, se los denomina “**puros o perfectos**” cuando un solo motivo es repetido  $n$  veces en serie [ej.  $(AC)_9$  ó  $(GT)_{15}$ ], “**compuestos**” cuando dos o más motivos son repetidos en serie [ej.  $(GT)_3(TG)_{10}$  ó  $(CA)_9(AC)_{16}$ ]. También pueden presentar nucleótidos intercalados entre los motivos repetidos, por ejemplo  $(CA)_2AA(CA)_{12}$  se los denomina “**puro interrumpido**”, y  $(CT)_4(GT)_2CTAT(GT)_{15}$  “**compuestos interrumpidos**”. Además las combinaciones entre cualquiera de las clases anteriores, sin ningún patrón (orden definido) se los denomina “**complejos**” (SCHLÖTTERER and HARR 2001; SCHÖTTERER 2004).

Los microsatélites son marcadores neutros con herencia mendeliana simple, codominantes, que presentan una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. El mecanismo de mutación predominante en el genoma es la sustitución de una base por otra. Aunque los microsatélites podrían acumular sustituciones de bases, también están expuestos a otro proceso de mutación, el cual se produce durante la replicación del ADN, conocido como slippage (deslizamiento), en el cual se produce la ganancia o pérdida de unidades de repetición. El modelo de mutación escalonado (SMM, por sus siglas en inglés) es actualmente el más utilizado para microsatélites, ya que estos mutan principalmente por una o unas pocas unidades de repetición (ELLEGREN 2004; SCHLÖTTERER and HARR 2001). Una de las principales utilidades de este tipo de marcador, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro

de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas (ELLEGREN 2004; FRANKHAM *et al.* 2002; JARNE and LAGODA 1996; SCHLÖTTERER 2004; SCHLÖTTERER and HARR 2001).

## **1.4. PREGUNTA O PROBLEMA CIENTÍFICO**

### **1.4.1. ¿Cuál es el nivel de diversidad y divergencia genética de la lagartija de lava de San Cristóbal (*Microlophus bivittatus*) alrededor de la isla?**

La diversidad alélica (número promedio de alelos por locus) es una medida utilizada para la cuantificación de la diversidad genética dentro de una población (FREELAND 2005). Aunque la riqueza alélica (número total de alelos observados en una población) es directamente proporcional al tamaño de la muestra (a mayor número de individuos – muestras, mayor número de alelos), la cuantificación de alelos únicos en una población dada ayuda a reducir el sesgo en la estimación de la riqueza alélica (KALINOWSKI 2002).

Teniendo en cuenta las diferencias geomorfológicas y el tiempo de emersión de las diferentes partes que conforman la Isla San Cristóbal (COLINVAUX and SCHOFIELD 1976), se infiere que las poblaciones de lagartijas de lava que habitan la parte más antigua de la isla presentaran mayor diversidad. Pero, por otro lado, su tipo de distribución (en anillo), aparentemente de forma continua alrededor de la isla, aunque con la posible existencia de núcleos de alta densidad en aquellas lugares con mejor hábitat (ej. para alimentarse, zonas de anidación) podría llevar a la conformación de “neighborhoods” (“demes”). Estos podrían existir si el flujo

genético por generación no es alto (BEKKEVOLD *et al.* 2005; GAGGIOTTI *et al.* 2009; JONES *et al.* 2004; JØRGENSEN *et al.* 2005).

## **1.5. HIPÓTESIS**

- En la Isla San Cristóbal la lagartija de lava endémica tiene un alto grado de estructuración poblacional aún cuando su distribución es aparentemente continua, o cuasi-continua, alrededor de la zona costera de la isla. Esta estructuración genética sería efecto de las características de su estrategia de vida, entre otras, su longevidad relativamente corta y en particular debido a su comportamiento territorial y poliginia basada en territorio que potencialmente los convierte en organismos relativamente sedentarios. Se predice, además, que la distancia de dispersión por generación de individuos a lo largo de la costa sea relativamente corta.

## **1.6. OBJETIVOS**

### **1.6.1. Objetivo General**

Analizar la genética poblacional de la lagartija de lava (*Microlophus bivittatus*) endémica de la Isla San Cristóbal, como parte de la línea base para su manejo y conservación.

### 1.6.2. Objetivos Específicos

1. Determinar los niveles de diversidad genética de la lagartija de lava endémica de la Isla San Cristóbal, lo que nos permitirá determinar si la especie se encuentra en depresión endogámica o exogámica.
2. Analizar la tasa de flujo génico entre las cinco diferentes localidades estudiadas en la isla San Cristóbal, de esta forma se podrá inferir si la distribución de la especie es continua.
3. Comparar las distancias genéticas y geográficas entre los individuos de las cinco localidades analizadas en la isla San Cristóbal, mediante este análisis se podrá inferir si las poblaciones son o no panmíticas.
4. Analizar y comparar la estructura genética entre las poblaciones de *M. bivittatus* del noroeste y del sureste de la isla San Cristóbal.



## LITERATURA CITADA

- ALLENDORF, F. W., 1986 Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology* **5**: 181-190.
- AVISE, J. C., 1994 *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York, USA.
- AVISE, J. C., 2000 *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press, London, England.
- BEHEREGARAY, L. B., C. CIOFI, D. GEIST, J. P. GIBBS, A. CACCONE *et al.*, 2003 Genes record a prehistoric volcano eruption in the Galápagos. *Science* **302**: 75.
- BEHEREGARAY, L. B., J. P. GIBBS, N. HAVILL, T. H. FRITTS, J. R. POWELL *et al.*, 2004 Giant tortoise are not so slow: Rapid diversification and biogeographic consensus in the Galápagos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6514-6519.
- BEKKEVOLD, D., C. ANDRE, T. G. DAHLGREN, L. A. W. CLAUSEN, E. TORSTENSEN *et al.*, 2005 Environmental correlates of population differentiation in Atlantic Herring. *Evolution* **59**: 2656-2668.
- BENAVIDES, E., R. BAUM, D. MCCLELLAN and J. W. SITES, JR., 2007 Molecular phylogenetics of the lizard genus *Microlophus* (Squamata: Tropicuridae): Aligning and retrieving indel signal from nuclear introns. *Systematic Biology* **56**: 776-797.
- BENAVIDES, E., R. BAUM, H. M. SNELL, H. L. SNELL and J. W. SITES, JR., 2009 Island biogeography of Galápagos lava lizards (Tropicuridae: *Microlophus*): species diversity and colonization of the Archipelago. *Evolution* **63**: 1606-1626.
- BOWEN, B. W., 1999 Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* **8**: S5-S10.
- BREMNER, J., and J. PÉREZ, 2002 Demographic Dynamics, Gender, and Resource Use in the Galápagos Islands. *interCoast*.
- BROWN, A. F., L. M. KANN and D. M. RAND, 2001 Gene flow versus local adaptation in the northern acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*: insights from mitochondrial DNA variation. *Evolution* **55**: 1972-1979.
- CALSBEEK, R., and T. B. SMITH, 2003 Ocean currents mediate evolution in island lizards. *Nature* **426**: 552-555.

- CDF, and WWF, 2002 *Visión para la biodiversidad de las Islas Galápagos*, Puerto Ayora, Galápagos.
- CIOFI, C., G. A. WILSON and L. B. BEHEREGARAY, 2006 Phylogeographic history and gene flow among Giant Galápagos tortoises on Southern Isabela Island. *Genetics* **172**: 1727-1744.
- COLINVAUX, P. A., and E. K. SCHOFIELD, 1976 Historical Ecology in the Galapagos Islands: I. A Holocene Pollen Record from El Junco Lake, Isla San Cristobal. *The Journal of Ecology* **64**: 989-1012.
- CHRISTIE, D. M., R. A. DUNCAN, A. R. MCBIRNEY, M. A. RICHARDS, W. M. WHITE *et al.*, 1992 Drowned islands downstream from the Galápagos hotspot imply extended speciation times. *Nature* **355**: 246-248.
- DE VIENNE, D., and S. SANTONI, 1998 Les principales sources de marqueurs moléculaires, pp. 13-48 in *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*, edited by D. VIENNE. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- DIXON, J., and J. WRIGHT, 1975 A review of the lizards of the Iguanid genus *Tropidurus* in Perú. *Contribution of Science, Natural History Museum* **271**: 1-39.
- ELLEGREN, H., 2004 Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature* **5**: 436-445.
- EMERSON, B. C., 2002 Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Molecular Ecology* **11**: 951-966.
- FRANKEL, O. H., 1970 Variation, the essence of life. *Proceedings of the Linnean Society of New Wales* **95**: 158-169.
- FRANKEL, O. H., 1974 GENETIC CONSERVATION: OUR EVOLUTIONARY RESPONSIBILITY. *Genetics* **78**: 53-65.
- FRANKEL, O. H., and M. E. SOULÉ, 1981 *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRANKHAM, R., 1997 Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* **78**: 311-327.
- FRANKHAM, R., 1998 Inbreeding and Extinction: Island Populations. *Conservation Biology* **12**: 665-675.
- FRANKHAM, R., 2001 Inbreeding and extinction in island populations: Reply to Elgar and Clode. *Conservation Biology* **15**: 287-289.

- FRANKHAM, R., 2003 Genetics and conservation biology. *C.R. Biologies* **326**: S22-S29.
- FRANKHAM, R., 2005 Genetics and extinction. *Biological Conservation* **126**: 131-140.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU and D. A. BRISCOE, 2002 *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, New York.
- FRANKHAM, R., and K. RALLS, 1998 Conservation biology: Inbreeding leads to extinction. *Nature*: 441-442.
- FREELAND, J. R., 2005 *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- FROST, D. R., 1992 Phylogenetic analysis and taxonomy of the *Tropidurus* group of lizards. (Iguania: Tropiduridae). *American Museum Novitates* **3033**: 1-68.
- FROST, D. R., M. T. RODRIGUES, T. GRANT and T. A. TITUS, 2001 Phylogenetics of the Lizard Genus *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae: Tropidurinae): Direct Optimization, Descriptive Efficiency, and Sensitivity Analysis of Congruence Between Molecular Data and Morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**: 352-371.
- GAGGIOTTI, O. E., 2003 Genetic threats to population persistence. *Annales Zoologici Fennici* **40**: 155-168.
- GAGGIOTTI, O. E., D. BEKKEVOLD, H. B. H. JØRGENSEN, M. FOLL, G. R. CARVALHO *et al.*, 2009 Disentangling the effects of evolutionary, demographic, and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic Herring as a case study. *Evolution* **63**: 2939-2951.
- GILLET, E. M., 1999 DNA markers - Concepts and characteristics, pp. in ***Which DNA marker for which purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FWIV Programme Molecular Tools for Biodiversity***, edited by E. M. GILLET.
- GRANT, P. R., and R. GRANT, 2002 Unpredictable Evolution in a 30 - Year Study of Darwin's Finches. *Science* **296**: 707-711.
- GRANT, P. R., R. GRANT and J. C. DEUTSCH, 1996 Speciation and Hybridization in Island Birds [and Discussion]. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London* **351**: 765-772.
- HAMILTON, M. B., 2009 *Populations Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd.

- HANSKI, I., and O. E. GAGGIOTTI (Editors), 2004 *Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations*. Elsevier Inc., Oxford.
- HARRISON, S., 1994, pp. 111-128 in *Large-scale Ecology and Conservation Biology*, edited by P. J. EDWARDS, R. M. MAY and N. R. WEBB. Blackwell Scientific, Oxford.
- HUTCHINSON, D. W., and A. R. TEMPLETON, 1999 Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**: 1898-1914.
- JARNE, P., and P. J. L. LAGODA, 1996 Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* **11**: 424-429.
- JOLLIFFE, I. T., 2002 *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, New York, USA.
- JONES, M. E., D. PAETKAU, E. GEFFEN and C. MORITZ, 2004 Genetic diversity and population structure of Tasmanian devils, the largest marsupial carnivore. *Molecular Ecology* **13**: 2197-2209.
- JORDAN, M. A., R. L. HAMMOND, H. L. SNELL, H. M. SNELL and C. JORDAN, 2002 Isolation and characterization of microsatellite loci from Galápagos lava lizards (*Microlophus* spp.). *Molecular Ecology Notes* **2**: 349-351.
- JORDAN, M. A., and H. L. SNELL, 2008 Historical fragmentation of islands and genetic drift in populations of Galápagos lava lizards (*Microlophus albemarlensis* complex). *Molecular Ecology* **17**: 1224-1237.
- JORDAN, M. A., H. L. SNELL, H. M. SNELL and C. JORDAN, 2005 Phenotypic divergence despite high levels of gene flow in Galápagos lava lizards (*Microlophus albemarlensis*). *Molecular Ecology* **14**: 859-867.
- JØRGENSEN, H. B. H., M. M. HANSEN, D. BEKKEVOLD, D. E. RUZZANTE and V. LOESCHCKE, 2005 Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology* **14**: 3219-3234.
- JOST, L. O. U., 2008 GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* **17**: 4015-4026.
- KALINOWSKI, S. T., 2002 How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* **88**: 62-65.
- KARP, A., P. G. ISAAC and D. S. INGRAM (Editors), 1998 *Molecular tools for screening biodiversity. Plants and Animals*. Chapman & Hall, London.

- KIMURA, M., and J. F. CROW, 1964 The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**: 725-738.
- KIZIRIAN, D., A. TRAGER, M. A. DONNELLY and J. W. WRIGHT, 2004 Evolution of Galápagos Islands lava lizards (Iguania: Tropicuridae: *Microlophus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 761-769.
- KOLBE, J. J., R. E. GLOR, L. RODRÍGUEZ SCHETTINO, A. CHAMIZO LARA, A. LARSON *et al.*, 2004 Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* **431**: 177-181.
- LACY, R. C., 2000 Considering threats to the viability of small populations using individual-based models. *Ecological Bulletins* **48**: 39-51.
- LANDE, R., 1988 Genetics and Demography in Biological Conservation. *Science* **241**: 1455-1460.
- LANDE, R., 1995 Mutation and Conservation  
Mutación y conservación. *Conservation Biology* **9**: 782-791.
- LEVINS, R., 1969 Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America* **15**: 237-240.
- LEVINS, R., 1970 Extinction.
- LOPEZ, T. J., E. D. HAUSELMAN, L. R. MAXSON and J. W. WRIGHT, 1992 Preliminary analysis of phylogenetic relationships among Galapagos Island lizards of the genus *Tropidurus*. *Amphibia-Reptilia* **13**: 327-339.
- LUIKART, G., W. B. SHERWIN, B. M. STEELE and F. W. ALLENDORF, 1998 Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* **7**: 963-974.
- LYNCH, M., J. CORNER and R. BURGER, 1995 Mutational Meltdowns in Sexual Populations. *Evolution* **49**: 1067-1080.
- MANTEL, N., 1967 The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- MORITZ, C., 1994 Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **9**: 373-375.
- MORITZ, C., 1999 Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas* **130**: 217-228.

- MORITZ, C., 2002 Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Processes That Sustain it. *Systematic Biology* **51**: 238-254.
- MORITZ, C., and D. M. HILLIS, 1996 *Molecular Systematics: Context and Controversies in Molecular Systematics*, edited by D. M. HILLIS, C. MORITZ and B. K. MABLE. Sinauer Associates, Inc. Publisher, Massachusetts.
- NEI, M., 1972 Genetic Distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-292.
- NEI, M., 1973 Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 3321-3323.
- NEI, M., 1977 *F* - statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* **41**: 225-233.
- NEI, M., 1978 Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- PAETKAU, D., 1999 Using Genetics to Identify Intraspecific Conservation Units: a Critique of Current Methods. *Conservation Biology* **13**: 1507-1509.
- PARENT, C. E., A. CACCONE and K. PETREN, 2008 Colonization and diversification of Galápagos terrestrial fauna: a phylogenetic and biogeographical synthesis. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London* **363**: 3347-3361.
- PÉREZ, J., and K. BALTA, 2007 Ecology of the diurnal lizards community in the Reserva Nacional de Paracas, Ica, Peru. *Revista peruana de biología* **13**: 169-176.
- PRIMMER, C. R., A. J. VESELOV, A. ZUBCHENKO, A. POUTUTKIN and I. BAKHMET, 2006 Isolation by distance within a river system: genetic population structuring of Atlantic salmon, *Salmo salar*, in tributaries of the Varzuga River in northwest Russia. *Molecular Ecology* **15**: 653-666.
- QUISPIÚPAC, E., and J. PÉREZ, 2009 Diet of the beach lizard *Microlophus peruvianus* (Reptilia : Tropiduridae) in the Santo Domingo beach, Ica, Peru. *Revista peruana de biología* **15**: 129-130.
- RASSMANN, K., D. TAUTZ, F. TRILLMICH and C. GLIDDON, 1997 The microevolution of the Galápagos marine iguana *Amblyrhynchus cristatus* assessed by nuclear and mitochondrial genetic analyses. *Molecular Ecology* **6**: 437-452.
- RIBEIRO, M. M., S. MARIETTE, G. G. VENDRAMIN, A. E. SZMIDT, C. PLOMION *et al.*, 2002 Comparison of genetic diversity estimates within and among

populations of maritime pine using chloroplast simple-sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology* **11**: 869–877.

- SCOTTI, I., G. PAGLIA, F. MAGNI and M. MORGANTE, 1999 Microsatellite markers as a tool for the detection of intra- and interpopulational genetic structure, pp. in *Which DNA Marker for Which Purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FWIV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity*, edited by E. M. GILLET.
- SCHLÖTTERER, C., 2004 The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature* **5**: 62-70.
- SCHLÖTTERER, C., and B. HARR, 2001 Microsatellite Instability in eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- SCHÖTTERER, C., 2004 The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* **5**: 63-69.
- SHAFFER, M. L., 1981 Minimum Population Size for Species Conservation. *BioScience* **31**: 131-134.
- SLATKIN, M., 1985 Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 393-430.
- SLATKIN, M., 1987 Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**: 787-792.
- SLATKIN, M., 1991 Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res. Camb.* **58**: 167-175.
- SLATKIN, M., 1995 A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**: 457-462.
- SMITH, T. B., R. K. WAYNE, D. J. GIRMAN and M. W. BRUFORD, 1997 A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science* **276**: 1855-1857.
- SNELL, H. L., R. D. JENNINGS, H. M. SNELL and S. HARCOURT, 1988 Intrapopulation variation in predator-avoidance performance of Galapagos lava lizards: the interaction of sexual and natural selection. *Evolutionary Ecology* **2**: 353-369.
- SNELL, H. M., P. A. STONE and H. L. SNELL, 1996 A summary of geographical characteristics of the Galapagos Islands. *Journal of Biogeography* **23**: 619-624.

- SUNNUCKS, P., 2000 Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 199-203.
- TORIBIO, M., and C. CELESTINO, 2000 El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales Fuera de serie*: 249-260.
- WEIR, B. S., and C. C. COCKERHAM, 1984 Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- WRIGHT, J. W., 1983 The evolution and biogeography of the lizards of the Galapagos Archipelago: evolutionary genetics of *Phyllodactylus* and *Tropidurus* populations, pp. 123–155 in *Patterns of Evolution in Galapagos Organisms*, edited by R. I. BOWMAN and E. AL., San Francisco, USA.
- WRIGHT, J. W., 1984 The origin and evolution of lizards of the Galapagos Islands. *Terra* **1984**: 21–27.
- WRIGHT, S., 1943 Isolation by Distance. *Genetics* **28**: 114-138.
- WRIGHT, S., 1951 The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**: 323–353.



## CAPÍTULO II

### DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURACIÓN POBLACIONAL DE LA LAGARTIJA DE LAVA (*Microlophus bivittatus*) DE LA ISLA SAN CRISTÓBAL, GALÁPAGOS – ECUADOR.

#### 1. RESUMEN

Se analizaron la diversidad genética y la estructura poblacional en seis localidades de *Microlophus bivittatus* de la isla San Cristóbal. La heterocigosidad observada (0.530 - 0.698) y la diversidad alélica (6.67 - 7.50) fueron moderados en todas las localidades. Al correlacionar la diferenciación genética entre individuos con las distancias geográficas, el valor obtenido para  $R_{xy}$  fue 0.18 con una significancia de  $P_{\text{MANTEL}} = 0.0001$ . La diferenciación genética entre localidades fue baja ( $F_{\text{STGLOBAL}} = 0.031$ ,  $P = 0.001$ ) a nivel global. Para la comparación entre localidades se utilizaron 3 índices de diferenciación ( $F_{\text{ST}} = 0.21 - 0.15$ ;  $G'_{\text{ST}} = 0.089 - 0.480$ ;  $D = 0.019 - 0.174$ ), no se observó ninguna estructuración, lo cual puede ser explicado ya que la variación entre localidades es del 6 %, mientras la variación dentro de las localidades es del 87 %. Al analizar la variación entre regiones “norte - sur” y “este - oeste”, se observó que en la agrupación “norte - sur” la variación se explica: entre regiones 1 %, entre localidades 2 %, dentro de las localidades 32 % y entre individuos el 64 %. Mientras que en la agrupación “este - oeste” la variación se encuentra: entre regiones 0 %, el 11 % entre localidades, el 16 % entre individuos y el 73 % dentro de los individuos. Los valores  $F_{\text{IS}}$  variaron entre 0.066 y 0.277 y los valores de  $N_m$  se encuentra entre 1.32 y 12.88. Esto puede ser debido a que esta especie presenta una distribución continua a lo largo de la isla, y que el número de migrantes entre la misma es alta contribuyendo así a la hipótesis de que presentan un modelo de migración paso a paso circular (Stepping-Stone Model).

**Palabras clave:** diferenciación genética, diversidad genética, flujo génico, Galápagos, microsatélites, *Microlophus bivittatus*, Stepping-Stone Model (SSM).

## 2. INTRODUCCIÓN

San Cristóbal es la quinta isla más grande, la más oriental en la actualidad, y una de las más antiguas geológicamente del archipiélago (GEIST *et al.* 1998). Tiene una forma de rombo, con una superficie de 558 km<sup>2</sup> y su punto más alto se eleva a 730 metros (Colinvaux and Schofield 1976; Snell *et al.* 1996). La Isla San Cristóbal se compone de dos volcanes que se unieron. El suroeste de la mitad es un volcán escudo simétrico formado por la suave acumulación de lavas, que emergió hace 2,4 millones de años, la actividad continuó hasta cerca de 650.000 años atrás. En esta parte de la isla su suelo está dominado por roca volcánica y presenta una rica vegetación. El noreste de la mitad de la isla es un volcán activo más reciente, dominada por erupciones de NE-tendencias fisuras. Los flujos más recientes no son más que de unos pocos siglos de antigüedad (Colinvaux and Schofield 1976). En esta parte de la isla el suelo es más arcilloso y la vegetación es pobre.

La lagartija de lava *Microlophus bivittatus* (Peters 1871), originada como resultado de la primera colonización desde el continente, es endémica de la Isla San Cristóbal (BENAVIDES *et al.* 2007; BENAVIDES *et al.* 2009; KIZIRIAN *et al.* 2004; WRIGHT 1983; WRIGHT 1984). Esta especie, al igual que las otras especies de lagartijas de Galápagos, presentan una distribución en anillo a lo largo de las zonas del litoral y seca baja de las islas grandes, llegando escasamente a la zona de transición y casi nunca en la zona alta (SNELL *et al.* 1988; SNELL *et al.* 1996).

En los individuos de esta especie se observa un dimorfismo sexual, los machos presentan dos bandas de color blanco a cada lado del cuerpo, mientras que las hembras presentan en el área ventral-frontal una coloración naranja, la

cual en época de reproducción se vuelve más intensa. Viven en harems,, un macho con muchas hembras, son territoriales en aproximadamente un área de 5-10m<sup>2</sup> (Pérez and Balta 2007; Quispitúpac and Pérez 2009). Su estado es vulnerable (libro rojo del Ecuador e IUCN), su amenaza en la actualidad son los gatos domésticos y ferales (CDF and WWF 2002; Jiménez-Uzcatogui et al. 2011).

Debido a que tienden a preferir los mismos hábitats y utilizar los mismos recursos, los individuos en una población pueden interactuar unos con otros directamente (comportamientos territoriales y reproductivos), o indirectamente (uso de recursos comunes o la ocupación del hábitat común) (Freeland 2005). Los límites espaciales y temporales usualmente no pueden ser definidos con facilidad, a no ser que sean islas o parches de hábitats aislados, pero por lo general son vagos y difíciles de determinar. Teniendo en cuenta la definición dada por Krebs (1972) de población, y que *Microlophus bivittatus*, endémica de la isla San Cristóbal, que presenta un tipo de distribución (en anillo), aparentemente continua alrededor de la isla, con la posible existencia de núcleos de alta densidad en aquellos lugares con un mejor hábitat para alimentarse y reproducirse - anidación, lo que se vería reflejado en la conformación de “neighborhoods” (“demes”). Es importante tener en cuenta la estrategia de vida de esta especie, relativamente sedentaria, debido en particular a su comportamiento territorial y poliginia basada en territorio, lo que fomentaría una estructuración genética correlacionada a estos “neighborhoods”. Estos vecindarios podrían existir si el flujo genético por generación no es alto (Bekkevold et al. 2005; Gaggiotti et al. 2009; Jones et al. 2004; Jørgensen et al. 2005).

El conocimiento de la diversidad genética y la extensión espacial de las poblaciones (distribución/dispersión) y una comprensión de las influencias entre las especies, son parte integral del manejo y conservación de las mismas (Jones et al. 2004). El objetivo de este estudio es analizar la genética poblacional de la lagartija de lava (*Microlophus bivittatus*), especie endémica de la Isla San Cristóbal, como parte de la línea base para su manejo y conservación. Para lo cual se evaluó: i) niveles de diversidad genética, lo cual nos permitirá determinar si la especie se encuentra en depresión endogámica o exogámica; ii) tasa de flujo génico entre las cinco diferentes localidades estudiadas en la isla, que nos permitirá inferir si la distribución de la especie es continua; iii) correlación entre las distancias genéticas y geográficas entre los individuos de las cinco localidades analizadas dentro de la isla, lo que nos permitirá inferir si las poblaciones son o no panmíticas; iv) analizar y comparar la estructuración genética entre las localidades del noroeste y del sureste de la isla San Cristóbal.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. ÁREA DE ESTUDIO COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS**

Se muestrearon un total de seis localidades alrededor de la zona costera de la isla en dos periodos, agosto del 2009 y junio/julio del 2010. La localidad de Puerto Baquerizo Moreno (PBM) en el extremo suroccidente de la isla, donde se encuentra el mayor asentamiento humano fue dividida en dos sitios de muestreo, colectándose 15 muestras en cada uno; La Lobería (LLB) (junio/julio-2010) en el extremo sur-oriente y Cerro Tijeretas (CT) que se ubica al sur-occidente de la

punta sur de la Isla (agosto-2009). Hacia el nor-occidente de la isla se muestreo Playa Ochoa (PO), la distancia aproximada por la zona costera entre esta localidad y PBM es de 9.54 km (junio/julio-2010). La localidad Islote Lobos (IsLs) que se encuentra a 1.8 km de Playa Ochoa (junio/julio-2010). Siguiendo hacia el norte de la isla se muestreo la punta norte de la misma, conocida como Punta Pitt (PP). De igual manera se colectaron individuos de la parte turística (agosto-2009) y del área del campamento de vigilancia y monitoreo del Parque Nacional (junio/julio-2010), la distancia aproximada entre PP y PO es de 56.38 km (por la zona costera). Se prosiguió con el muestreo en la localidad de Bahía Rosa Blanca (BRB) (junio/julio-2010) que se ubica en la parte oriental de la isla. Entre esta localidad y PP la distancia por la zona costera es de 28.4 km. Siguiendo la zona costera unos 19 km se encuentra la localidad de Puerto Chino (PCh) (junio/julio-2010). Esta localidad se encuentra a aproximadamente 31.78 km de PBM (Figura 1).

La toma de muestras de tejido (últimos 50-150 mm de la cola) se realizó en los individuos capturados en cada localidad con el permiso del Parque Nacional Galápagos – Ecuador: PC-06-09 y Autorización No. 067-2009 PNG. En cada una de las localidades se permitió la colecta de un total de 30 individuos por localidad. Con la finalidad de causar la menor perturbación, para la colección del tejido se utilizó el siguiente método: se cortó entre 0.5 y 1.5 cm de la cola. El tejido se colocó en tubos de 2 ml de tapa rosca con etanol al 95% para su preservación.

Las muestras fueron llevadas al laboratorio del Campus de la Universidad San Francisco de Quito en Galápagos (GAIAS) donde se las preparó para ser transportadas a Quito para su posterior análisis. La colección realizada en el mes

de agosto del 2009 (25 individuos) fue transportada con el Permiso de Exportación de Muestras No. 067/2009 PNG. Mientras que la colección realizada durante junio/julio del 2010 (126 individuos) se la transportó con el Permiso de Exportación de Muestras No. 072/2010 PNG.

### **3.2. DETECCIÓN DE LA VARIACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES**

Los análisis moleculares se realizaron en el laboratorio de Genética Molecular (113) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), con financiamiento del Instituto Académico Galápagos para las Artes y las Ciencias (GAIAS-USFQ) como parte del proyecto “Diversidad Genética, estructura poblacional y evaluación del impacto de los gatos domésticos y ferales en la población, comportamiento y ecología de la lagartija de lava de San Cristóbal (*Microlophus bivittatus*)” de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ).

La extracción de ADN a partir de las 151 muestras de tejido (Anexo 1) fue realizada utilizando el kit de PROMEGA “Wizard® Genomic DNA purification” y se siguió el protocolo propuesto por el fabricante para cola de ratón – Technical Manual (p. 12) descrito en Anexo 2. La cuantificación del ADN se realizó con ayuda del equipo NANODROP 1000 (v.3.7). Donde se colocó 1 µl de la muestra, y mediante espectrofotometría se obtuvo la concentración de ADN (ng/µl) y también se conoció la calidad o pureza del mismo, mediante la relación de absorbancia de la muestra a 260 nm (ADN) y 280 nm (proteínas). Si el valor es mayor-igual a 1.8 la calidad/pureza del ADN es alta (User’s manual NanoDrop 1000 v3.7). También

se corrió un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para conocer la calidad del ADN.

Los doce microsatélites usados en este estudio son los reportados por Jordan et al. (2002) para el género (Anexo 3). El volumen final de reacción fue de 15  $\mu$ l, el cual incluía 2,5 ng de ADN, 100  $\mu$ M de dNTP's (PROMEGA®), 0.24  $\mu$ M de cada primer (forward y revers), buffer PCR 1X, 0,75 U de Taq (Go flexi taq – PROMEGA®) y tres diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM (MIC01 y MIC09), 2,5 mM (MIC02 – MIC04, MIC06 – MIC08 y MIC10 – MIC12) y 4 mM (MIC05). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés), se realizó mediante un protocolo “touchdown”, el cual consistió en una denaturación inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 15 ciclos: denaturación a 94°C por 20 segundos, Annealing a 60°C, decreciendo un grado de temperatura por ciclo, y extensión a 72°C por 30 segundos, seguido de 20 ciclos: denaturación 94°C por 20 segundos, Annealing a 45°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos; seguido de una extensión final a 72°C por siete minutos (Jordan et al. 2002).

Los polimorfismos fueron visualizados en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% (acrilamida – bisacrilamida 19:1) y úrea 5M; la electroforesis se realizó en cámaras verticales Sequi-Gen®, BioRad. Los geles fueron revelados mediante la técnica de tinción plata (Benbouza et al. 2006; Creste et al. 2001). Se registraron las distancias migradas desde el frente de carga, por cada uno de los pesos conocidos de la escalera 30 – 330 pb de Invitrogen™, en centímetros. También se registraron las distancias migradas por los alelos obtenidos. Con estos datos se realizó un gráfico de dispersión, siendo la variable dependiente los

pesos conocidos (pb) y la variable independiente la distancia migrada (cm). A este gráfico se le agregó una línea de tendencia logarítmica. El peso molecular en pares de bases (pb) se obtuvo reemplazando la distancia migrada por cada alelo por x en la ecuación de la pendiente  $a = mx + b$ . Estos valores fueron tabulados en una matriz alélica que fue sometida a los diferentes análisis estadísticos.

### **3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

#### **3.3.1. Desequilibrio Ligado**

Para comprobar si los diferentes loci utilizados en este estudio son independientes entre sí o se encuentran asociados, se realizó un análisis de desequilibrio ligado. Esta prueba descrita por Weir (1996) como una prueba de desequilibrio ligado compuesto, consiste en una asociación entre pares de loci diploides. Se crean tablas de contingencia para cada par de loci, y se calcula una prueba G (estadístico de relación de probabilidad del logaritmo) para cada tabla usando el algoritmo de Markov (RAYMOND and ROUSSET 1995a). Para este análisis se utilizó el programa GenePop (RAYMOND and ROUSSET 1995b) con los valores *default* de los parámetros de la cadena de Markov (número de dememorización: 1000, número de lotes: 100, número de interacciones: 1000).

#### **3.3.2. Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE)**

El equilibrio Hardy-Weinberg es uno de los conceptos centrales de varios modelos de diversidad y diferenciación genética. Si conocemos las frecuencias alélicas iniciales en una población, el equilibrio Hardy - Weinberg permite predecir



la proporción de genotipos diploides en la siguiente generación, siempre que la población esté bajo panmixia (apareamiento al azar entre todos los individuos de una población), que no exista ningún tipo de selección (natural o sexual), migración o mutación, que el tamaño sea infinito y que los alelos se segreguen siguiendo las leyes de herencia mendelianas (FREELAND 2005; LOWE *et al.* 2004). Este análisis se realizó en el programa GenePop (RAYMOND and ROUSSET 1995b), el cual utiliza una prueba de probabilidad conocida como “Prueba Exacta Hardy – Weinberg” (HALDANE 1954). En esta prueba, la probabilidad de las muestras observadas es utilizada para definir la zona de rechazo, y los valores  $p$  corresponden a la suma de las probabilidades de todas las tablas con la misma probabilidad. Al identificar más de seis alelos, el programa automáticamente utilizó el algoritmo de cadena de Markov para estimar el valor exacto de los valores  $P$  sin ningún tipo de sesgo (GUO and THOMPSON 1992). Se utilizaron los valores *default* de los parámetros de la cadena de Markov (número de demorización: 1000, número de lotes: 100, número de iteraciones: 1000). El programa calculó automáticamente un test global (Método de Fisher) para conocer los valores globales Hardy-Weinberg y las desviaciones del equilibrio de cada población.

### **3.3.3. Diversidad Genética**

La riqueza alélica ( $I$ ) fue estimada como el número de alelos por individuo en cada localidad y en el conjunto de las mismas. La diversidad alélica ( $A$ ), el número de alelos únicos para cada localidad, el número de alelos efectivos ( $N_e$ ) y el número de migrantes ( $N_m = (1 - F_{ST}) / (2F_{ST})$ ) se calculó por medio de los programas

FSTAT ver. 2.9.3.2 (GOUDET 1995), Arlequin ver. 3.5.1.2 (EXCOFFIER and LISCHER 2010) y GenAIEx 6.3 (PEAKALL and SMOUSE 2006). La diversidad y riqueza alélica fue evaluada para cuantificar la variación intraespecífica de las diferentes localidades y a su vez de la isla San Cristóbal. El índice de Garza-Williamson (2001) ( $G-W = k / (R - 1)$ ), que nos permite detectar reducciones en el tamaño de las poblaciones mediante loci de microsatélites. Este índice ha demostrado ser sensible a cuellos de botella en poblaciones, ya que el valor disminuye cuando la población ha sufrido una disminución en tamaño. La magnitud de la reducción se correlaciona positivamente con la gravedad y duración de la reducción del tamaño. Este índice fue calculado en el programa Arlequin ver. 3.5.1.2 (EXCOFFIER and LISCHER 2010). Para el cálculo de las heterocigosidades esperadas y observadas ( $H_o$  y  $H_e$ ) se utilizaron los programas Arlequin ver. 3.5.1.2 (EXCOFFIER and LISCHER 2010) y GenAIEx 6.3 (PEAKALL and SMOUSE 2006). La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) se calcula al dividir el número de heterocigotos en un locus en particular por el número total de individuos muestreados (FREELAND 2005). La Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), también conocida como diversidad génica ( $h$ : Nei 1987), se define como la probabilidad que dos haplotipos al azar sean diferentes dentro de la muestra. Con los programas GenePop (RAYMOND and ROUSSET 1995b) y Arlequin ver. 3.5.1.2 (EXCOFFIER and LISCHER 2010) se calculó el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ). Este coeficiente describe la divergencia de la Heterocigosidad observada dentro de las poblaciones con la de la población total asumiendo panmixia (LOWE *et al.* 2004). Esto refleja la probabilidad de que dos alelos dentro de un mismo individuo sean idénticos por descendencia. El programa GenePop (RAYMOND and ROUSSET 1995b) calculó un análisis global del  $F_{IS}$  basado en Weir & Cockerham (1984). Para estos análisis se trabajó con seis

localidades Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

### 3.3.4. Diferenciación Genética

Actualmente existe un debate sobre cual índice se debe usar para evaluar la diferenciación genética entre las poblaciones (GERLACH *et al.* 2010; HEDRICK 1999; HEDRICK 2005; NEIGEL 2002). Jost (2008) en su trabajo comprueba matemáticamente que los índices  $G_{ST}$  y sus relativos ( $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$ , etc.) pueden dar valores cercanos a cero cuando la diversidad genética es alta, aunque las poblaciones se encuentren completamente diferenciadas. En este trabajo Jost propone el índice  $D$ , el cual permite evaluar la diferenciación entre poblaciones que reportan  $G_{ST}$ ,  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$ , entre otros, cercanos a 0 y se encuentran totalmente aisladas entre ellas. Existen trabajos en los cuales se comprueba y se recomienda usar el índice de diferenciación  $D$  como una verdadera medida de diferenciación (GERLACH *et al.* 2010; HELLER and SIEGISMUND 2009; JOST 2008) y otros en los que se defiende el uso de índices como el  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  o  $G_{ST}$  (RYMAN and LEIMAR 2009; WHITLOCK 2011).

Se calculó el estadístico “clásico”  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham 1984), el cual describe la reducción de la heterocigosidad dentro de una población, con respecto a la población total, debido a selección o deriva (Lowe *et al.* 2004). Se calcula de la siguiente forma:

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

Donde  $H_T$  es la heterocigosidad esperada del total de las poblaciones, y  $H_S$  es la heterocigosidad que se podría esperar si la población está en equilibrio Hardy-Weinberg (Freeland 2005). Para el cálculo del  $F_{ST}$  entre poblaciones se utilizó el programa Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005), con 1000 permutaciones y los valores p fueron calculados con una significación de 0.05.

Adicionalmente se utilizó el programa SMOGD (Crawford 2010) para el cálculo de los índices de diferenciación  $G'_{ST}$  (Hedrick 2005) y  $D$  (Jost 2008).

El índice  $D$  puede ser calculado de la siguiente manera:

$$D = [(H_T - H_S) / (1 - H_S)] [n / (n - 1)]$$

Donde  $H_T$  es la heterocigosidad total,  $H_S$  es la heterocigosidad media de cada población, y  $n$  es el número de poblaciones (Jost 2008).

Mientras que el  $G'_{ST}$  puede ser calculado de la siguiente forma:

$$G'_{ST} = [G_{ST} (1 + H_S)] / (1 - H_S)$$

Donde  $G_{ST}$  es la variación entre poblaciones, en relación con la variación de la población total y  $H_S$  es la heterocigosidad media de cada población que se encuentran en equilibrio Hardy – Weinberg (Hedrick 2005).

Para visualizar la diferenciación entre las localidades estudiadas se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con las matrices de  $F_{ST}$ ,  $G_{ST}$  y  $D$  en el programa GenAlEx 6.3 (Peakall and Smouse 2006). El PCoA es un análisis multivariado que nos permite reducir las dimensiones de un set de datos, preservando la mayor cantidad de información posible. Mediante este análisis, los

datos se transforman en un sistema de coordenadas (los componentes principales) que son funciones lineales de las variables originales (Jolliffe 2002).

Adicionalmente para conocer si existe estructuración poblacional dentro de la isla, se realizó el Test de Mantel (1967). El principio de este análisis es correlacionar dos o más matrices utilizando permutaciones. La correlación se realizó entre las distancias geográficas (entre localidades), con las matrices obtenidas para la distancia genética Nei (1972),  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham 1984),  $G'_{ST}$  (Hedrick 2005) y  $D$  (Jost 2008). Este análisis fue realizado en el programa GenAEx 6.3 (Peakall and Smouse 2006).

Para estos análisis se trabajó con siete localidades, siendo estas: PP, BRB, PCh, PO, IsLs y a PBM se la dividió en dos Cerro Tijeretas (CT) y La Lobería (LLb), al noroeste y sureste del asentamiento humano, respectivamente.

### **3.3.5. Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA)**

La estructura genética de las poblaciones y los niveles de variación en los individuos fueron analizados con el Análisis de Variancia Molecular (AMOVA). El AMOVA fue realizado en Arlequin 3.0 (EXCOFFIER *et al.* 2005) y GenAEx 6.3 (PEAKALL and SMOUSE 2006). Para la ejecución del AMOVA se agrupó a las localidades de dos formas, la primera basándonos en el eje latitudinal, donde los grupos de acuerdo a su posición en la isla San Cristóbal fueron: grupo “Norte” con las localidades Punta Pitt (PP) y Bahía Rosa Blanca (BRB); mientras que las localidades Cerro Tijeretas (CT) y La Lobería (LLb) conforman el grupo “Puerto Baquerizo Moreno”, y las localidades Playa Ochoa (POch), Islote Lobos (IsLs) y

Puerto Chino (PCh) conformaban el grupo “Sur”. La segunda agrupación de las localidades se basó en el eje longitudinal, donde las localidades PCh, PP y BRB conforman el grupo “Este”, y las localidades POch, IsLs, CT y LLb pertenecen al grupo “Oeste”. Con este análisis se calcularon los componentes de variación y sus niveles de significación (basado en procedimientos de permutación) para los niveles jerárquicos: entre grupos (Sur-Norte-Puerto Baquerizo Moreno y Este-Oeste), entre localidades dentro de los grupos, entre los individuos dentro de las localidades y entre individuos. Los AMOVAs y los niveles de significación se calcularon con 1000 permutaciones.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. OBTENCIÓN DE ADN Y DE DATOS.**

La extracción de ADN genómico fue exitosa utilizando el kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”. Las concentraciones variaron entre 2.38 y 293.63 nanogramos por microlitros (ng/μl). Todas las muestras fueron diluidas para estar todas a la misma concentración que la menor (2.38 ng/μl). Las muestras que presentaron altas concentraciones, se guardó un stock madre con la concentración inicial (Anexo 3).

Se amplificaron un total de 12 primers descritos por Jordan et al. (2002), de los cuales ocho son de motivo de repetición simple y cuatro con motivos de repetición compuestos (Anexo 4). Todos los primers presentaron 100% de polimorfismo. El porcentaje de datos perdidos varía entre 2.6 % (Mic1) y 0.7% (Mic8, Mic10 y Mic11). Un total de 102 alelos fueron observados en los 12 loci a

través de las cinco localidades. El número promedio de alelos por locus varió entre 13 (Mic03) y cuatro (Mic09 y Mic11). Solo se presentaron alelos únicos en los loci Mic04 y Mic06 (Tabla 1, Anexo 5).

## **4.2. DESEQUILIBRIO LIGADO Y EQUILIBRIO HARDY – WEINBERG**

Con una significación de 0.05 se encontraron algunos pares de loci en desequilibrio ligado en cada localidad. En la localidad Punta Pitt (PP) se encontró que el 16.67% de los pares de loci están ligados (11 pares). La localidad Bahía Rosa Blanca (BRB) presentó el 22.06% de loci ligados (15 pares), en las localidades Playa Ochoa (POch) y Puerto Chino (PCh) el 12.12% de los loci se encuentran ligados. Mientras que la localidad Puerto Baquerizo Moreno presentó un 19.7% de loci ligados, que al ser analizadas las dos sublocalidades Cerro Tijeretas (CT) y La Lobería (LLb) presentaron el 6.06% y el 7.58% respectivamente (Anexo 6). También se realizó un test global (método de Fisher) para cada par de loci con todas las muestras. Los pares de loci que mostraron estar en desequilibrio ligado con un valor  $P$  significativo ( $P \leq 0.05$ ) son Mic01 - Mic07, Mic03 - Mic11, Mic04 - Mic07, Mic05 - Mic08, Mic06 - Mic11, Mic07 - Mic10 y Mic09 - Mic11. Mientras que los pares de loci con un valor  $P$  altamente significativos ( $P \leq 0.01$ ) son Mic01 - Mic05, Mic01 - Mic08, Mic02 - Mic03, Mic04 - Mic10, Mic05 - Mic11, Mic05 - Mic12, Mic06 - Mic07, Mic6 - Mic9, Mic07 - Mic08, Mic08 - Mic12 y Mic11 - Mic12 (Anexo 7).

El análisis global (test de Fisher) del equilibrio Hardy-Weinberg dio valores con los que se pudo comprobar que ninguna de las localidades se encuentra en

equilibrio Hardy-Weinberg, ya que todas presentaron frecuencias de genotipos que difieren significativamente de aquellas esperadas en poblaciones en equilibrio Hardy-Weinberg (Anexo 8). Con una significación de 0.05, se encontró que cinco loci no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg en la localidad de Punta Pitt (PP) (Mic01, Mic02, Mic04, Mic07 y Mic10), ocho en Bahía Rosa Blanca (BRB) (Mic1, Mic2, Mic4 - Mic6 y Mic8 - Mic10), nueve en Puerto Chino (PCh) (Mic04 - Mic12), seis en Playa Ochoa (PO) (Mic01, Mic05 - Mic08 y Mic10) y siete en Puerto Baquerizo Moreno (PBM) (Mic01, Mic02, Mic04, Mic07, Mic09 y Mic10); al analizar las sublocalidades de PBM, tres loci en Cerro Tijeretas (Mic01, Mic09 - Mic11), cinco en La Lobería (Mic01, Mic02, Mic04, Mic07 y Mic10). A nivel de locus, Mic03 fue el único que se encontró bajo equilibrio Hardy-Weinberg (Anexo 9).

### **4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA**

Un total de 102 alelos fueron observados en los 12 loci a través de las seis localidades muestreadas (Anexo 5). La localidad de Puerto Baquerizo Moreno (PBM) es la que mayor número de alelos presentó (94), mientras que la de menor número de alelos fue Islote Lobos (IsLs) (54). El número promedio de alelos por locus por localidad varió entre 7.833 para PBM y 4.50 en IsLs. Solo las localidades Islote Lobos y Puerto Chino presentaron alelos únicos para los loci Mic04 y Mic06 (Tabla 1).

Al analizar las heterocigosidades observadas y esperadas globales tenemos que la heterocigosidad esperada fue de 0.8109 (sd = 0.0271) y la heterocigosidad observada fue de 0.6099 (sd = 0.0115). Para cada una de las localidades en cada locus, se puede observar que Punta Pitt presentó heterocigosidades observadas



mayores a las esperadas en los loci Mic05, Mic06, Mic11 y Mic12; para Bahía Rosa Blanca los loci Mic01, Mic03, Mic06 y Mic11; en Puerto Baquerizo Moreno los loci Mic01, Mic05, Mic06, Mic11 y Mic12; mientras que para Puerto Chino y Playa Ochoa solo el loci Mic02 (Tabla 2). Sin embargo, en todas las localidades la media de la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) fue menor a la esperada ( $H_e$ ). La localidad con mayor heterocigosidad observada ( $H_o = 0.673$ ) es Puerto Baquerizo Moreno (PBM), que también presentó el mayor valor para la heterocigosidad esperada ( $H_e = 0.780$ ) (Tabla 2, Figura 3).

La diversidad genética de Nei (1987) global fue de 0.8109. Mientras que por localidades variaron en un rango de 0.70 (PO) y 0.795 (PBM) (Tabla 3). La diversidad alélica ( $A$ ) total fue de 8.167, la localidad con menor valor reportado fue Bahía Rosa Blanca ( $A = 6.67$ ), mientras que Puerto Baquerizo Moreno ( $A = 7.833$ ) la que mayor valor presentó (Tabla 2). La riqueza alélica total ( $I$ ) fue de 7.884, la localidad con mayor valor reportado fue Puerto Baquerizo Moreno ( $I = 7.815$ ), mientras que la que menor valor reportó fue Bahía Rosa Blanca ( $I = 6.648$ ) (Tabla 4).

Los valores obtenidos para el índice de Garza-Williamson (2001) variaron entre 0.291 (BRB) y 0.318 (PO) (Tabla 5). Para el coeficiente de endogamia - consanguinidad los valores promedios para las localidades todos fueron positivos y se encontraron entre 0.132 (PP) y 0.283 (PCh). Mientras que para cada loci los valores se encontraron entre -0.103 (Mic11) y 0.426 (Mic10) (Tabla 6).

## 4.4. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

### 4.4.1. Entre Individuos

Se obtuvo una matriz de distancia genética “Simple Matching” por comparación entre los 151 individuos analizados, la cual fue graficada en un análisis de Coordenadas Principales (PCoA), donde en el primer eje explica el 39.68 % de la variación y el segundo eje explica el 15.25 % de la misma (Anexo 10). También se realizó un análisis factorial de correspondencia (AFC), donde el primer eje explica el 52.78 %, el segundo eje el 21.55 % y el tercer eje el 15.96 % de la variación (Anexo 11) y uno de agrupamiento “Neighbor Joining” (Figura 3). Al correlacionar las distancias geográficas entre individuos y distancias genéticas (Simple Matching) se observó un coeficiente de correlación de  $R_{xy} = 0.18$  ( $P \leq 0.01$ ) (Figura 4).

### 4.4.2. Entre Localidades

Se obtuvieron matrices de las seis localidades, utilizando varios índices de diferenciación  $F_{ST}$  (WEIR and COCKERHAM 1984),  $G'_{ST}$  (HEDRICK 2005) y  $D$  (JOST 2009) con una significación de 0.05 (Tablas 7 - 9), también se calcularon las distancias genéticas de Nei (1972) y Slatkin (1985) (Tablas 10 y 11). A todas estas matrices se les sometió a un análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figuras 5 - 9), además de ser utilizadas para realizar un análisis de correlación (MANTEL 1967) entre éstas y las distancias geográficas entre localidades (Tabla 12) (Figuras 10 - 14).

Los valores para el índice de diferenciación de Weir & Cockerham (1984) ( $F_{ST}$ ) más bajos, se presentaron entre las localidades Punta Pitt (PP) y Bahía Rosa Blanca (BRB) ( $F_{ST} = 0.021$ ), mientras que los más altos se encontraron entre Bahía Rosa Blanca (BRB) y Playa Ochoa (POch) ( $F_{ST} = 0.176$ ) (Tabla 8). Al graficar los  $F_{ST}$  por pares de localidades, mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA), se observó que el primer eje explica el 90.73 % y el segundo eje el 5.77 % de la variación (Figura 5). Al correlacionar estos valores con la distancia geográfica entre localidades, el valor obtenido para el índice de correlación fue  $R_{xy} = -0.218$  ( $P_{MANTEL} = 0.239$ ) (Figura 10).

Se observó que los valores para el índice de diferenciación de Hedrick (2005) ( $G'_{ST}$ ) se encontraban entre 0.089 (PP y BRB) y 0.480 (BRB y PO) con valores  $P \leq 0.01$  (Tabla 9). En el análisis de coordenadas principales se pudo observar que en los dos primeros ejes se explica el 89.26 % de la variación (Figura 6). Al realizar el test de Mantel entre estos valores y distancias geográficas entre localidades, se observó un índice de correlación negativo ( $R_{xy} = -0.191$ ;  $P_{MANTEL} = 0.26$ ) (Figura 11).

Para el índice de diferenciación de Jost (2009) ( $D$ ) los valores se encontraban entre 0.081 (PP y BRB) y 0.445 (BRB y PO) (Tabla 10). En el análisis de coordenadas principales para estos valores, se observó que el primer eje explica el 74.32 % y en el segundo el 15.46 % de la variación (Figura 7). De igual forma al correlacionar este índice con las distancias geográficas se obtiene un valor de  $-0.171$  ( $P_{MANTEL} = 0.308$ ) (Figura 12).

Al analizar entre las localidades la distancia genética de Nei, se observó que los valores se encuentran entre 0.104 (PP y BRB) y 0.839 (BRB y PO) (Tabla 11).

Al realizar el análisis de coordenadas principales se pudo observar que el primer eje explica el 88.24 %, mientras que el segundo eje el 7.87 % (Figura 8). Al ser correlacionada con las distancias geográficas (entre localidades), se observó que el coeficiente de correlación  $R_{xy} = -0.245$  ( $P_{MANTEL} = 0.197$ ) (Figura 13).

Para las distancias genéticas de Slatkin, se pudo observar que los valores se encuentran entre 0.021 (PP y BRB) y 0.214 (BRB y PO) (Tabla 12). En el PCoA se observó que el primer eje explica el 91.88 % de la variación y que el segundo eje explica el 5,70 % (Figura 9). Al realizar el test de Mantel se observó que el índice de correlación  $R_{xy} = -0.211$  ( $P_{MANTEL} = 0.25$ ) (Figura 14).

En todos los análisis de coordenadas principales se observó que el primer eje separa las localidades PP y BRB (grupo “norte”) de las localidades PCh y PO (grupo “sur”), con excepción de las localidades pertenecientes a Puerto Baquerizo Moreno (CT y LLb) que se encuentran junto a las del norte. El segundo eje separa las localidades del que se encuentran al este de la isla (BRB, PCh y PP), de aquellas que se encuentran al oeste de la misma (POch, LLb y CT) (Figuras 5 - 9). Pero al analizar la correlación entre las matrices de índices de diferenciación o distancias genéticas con la matriz de distancias geográficas ningún valor  $P$  fue significativo y todos los valores  $R_{xy}$  fueron negativos (Figuras 10 - 14).

#### **4.4.3. Análisis Molecular de la Variancia (AMOVA)**

Al analizar la variación molecular jerárquicamente: a) grupos, b) entre localidades dentro de grupos, c) entre individuos dentro de localidades, y d) dentro de individuos; las seis localidades fueron congregadas en 3 grupos (“norte = PP y BRB”, “Puerto Baquerizo Moreno = CT y LLb” y “sur = PCh y PO”), se

observó que la variación entre grupos es de 9.45 %. La variación entre localidades dentro de grupos es donde se encuentra el menor porcentaje de variación (2.65 %). Entre individuos dentro de localidades la variación explicada es de 15.28 %, mientras que el mayor porcentaje de variación se encuentran dentro de los individuos (72.63 %). Los componentes de variación varían entre 0.13277 ( $V_b$  = entre localidades dentro de grupos) con su índice de fijación ( $F_{CT} = 0.09447$ ,  $P \leq 0.001$ ) y 3.63907 ( $V_d$  = dentro de individuos) con su índice de fijación ( $F_{IS} = 0.17378$ ,  $P \leq 0.001$ ) (Tabla 13; Figura 15a). Al realizar un AMOVA con las seis localidades, congregadas en 2 grupos (“oeste = PP, PO y CT” y “este = BRB, PCh y LLb), se pudo observar que en este análisis jerárquico la mayor variación se encuentra dentro de los individuos (64 %), que entre los individuos dentro de las localidades se encuentra el 32 % de la variación; mientras que la variación explicada entre localidades dentro de grupos solo es del 4 % y que entre grupos el porcentaje de explicación es de 0. Los componentes de variación se encuentran entre -0.18971 ( $V_a$  = entre grupos) con su índice de fijación ( $F_{IT} = 0.2475$ ,  $P \leq 0.001$ ) y 3.63907 ( $V_d$  = dentro de individuos) con su índice de fijación ( $F_{IS} = 0.17378$ ,  $P \leq 0.001$ ) (Tabla 14; Figura 15b). Los índices  $F_{IS}$  específicos para cada localidad que se observaron se encuentran entre 0.066 (CT) y 0.277 (PCh) (Tabla 15).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. DESEQUILIBRIO LIGADO Y EQUILIBRIO HARDY – WEINBERG

De un total 60 combinaciones de loci (12) y localidades (5), todas fueron polimórficas. Como se pudo observar en la Isla San Cristóbal (Tabla 1) varios pares de loci se encuentran ligados a nivel global (18 pares). Dentro de las diferentes localidades Puerto Chino (PCh) es la que menor número de loci ligados presentó (cuatro pares de loci), mientras que Bahía Rosa Blanca (BRB) fue la que más pares de loci ligados presentó (15 pares de loci) (Tabla 2). Este fenómeno de loci ligados se observa principalmente cuando ha existido deriva génica, reducción de tamaño poblacional (cuellos de botella, endogamia) o una mezcla reciente de poblaciones debido a que no ha existido el suficiente tiempo para que los loci se clasifiquen independientemente (LOWE *et al.* 2004). El hecho que varios pares de loci se encuentren ligados, podría explicar en parte que las localidades no se encuentren bajo equilibrio Hardy-Weinberg. Una de las condiciones para que las poblaciones se encuentren en equilibrio es que los loci sigan leyes de herencia mendeliana, pero al estar ligados y no segregarse independientemente, rompen el equilibrio (FREELAND 2005). Sin embargo existen localidades que no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 3) y no poseen pares de loci en desequilibrio ligado, por lo que la migración, deriva génica u otros motivos podrían estar rompiendo el equilibrio (FRANKHAM *et al.* 2002; FREELAND 2005; GAGGIOTTI *et al.* 2009). Hay que tener en cuenta que esta especie presenta selección sexual, ya que solo aquellos machos que presenten un mayor “display” serán los que pasaran sus genes a la siguiente generación (PÉREZ Z. and BALTA 2007; RAMÍREZ

*et al.* 2007; VIDAL *et al.* 2002), esto va totalmente en contra de lo que se espera en una población panmítica, lo que explicaría principalmente la ausencia de equilibrio HW (MILES *et al.* 2001).

## 5.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

*Microlophus bivittatus* en las cinco localidades de la isla San Cristóbal presentó 98 alelos, y solo la localidad de Puerto Chino (PCh) presentó alelos únicos (Tabla 5). Al comparar estos resultados con el estudio realizado por Jordan y Snell (2008), donde observaron más alelos únicos en las localidades de las islas grandes (Santa Cruz, Santiago y Santa Fe), se podría inferir que la población de *M. bivittatus* presenta menor diversidad que *M. albemarensis*. Pero hay que tener en cuenta que para este estudio se colectaron las muestras durante los veranos de los años 2009 y 2010, mientras que las colecciones de tejidos para el estudio de Jordan y Snell (2008) se realizaron entre los años 1991 y 1995. Aunque según los autores la naturaleza temporal de la muestra no afectaría a los patrones espaciales que se investigaron (Snell, unpublished data) pero si el número de individuos colectados. Los valores obtenidos para las distintas medidas de diversidad genética global ( $A = 8.167$ ;  $Nei = 0.8109$ ;  $I = 7.884$ ), como para cada localidad (Tablas 5 - 8) son relativamente altos y se encuentran dentro del rango observado para otros vertebrados (DEWOODY and AVISE 2000; NEFF and GROSS 2001). Por otro lado al observar las frecuencias alélicas en las cinco localidades (figura 1) podemos observar que aunque los alelos se comparten las frecuencias varían entre ellas, lo que nos llevaría a pensar que existe flujo génico entre las localidades.

### 5.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

En la naturaleza es difícil conocer a priori los límites para definir claramente una subpoblación (BALLOUX and LUGON-MOULIN 2002), por este motivo las muestras de las seis localidades se analizaron como pertenecientes a seis subpoblaciones. Los índices de fijación ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$ ) nos permiten evaluar la heterocigosidad en poblaciones. Son definidos en términos de tres heterocigosidades: la heterocigosidad observada dentro de las subpoblaciones ( $h_o$ ), la heterocigosidad esperada dentro de las subpoblaciones ( $h_s$ ) y la heterocigosidad total esperada ( $h_T$ ). Para comprobar la hipótesis de que las localidades muestreadas corresponden a subpoblaciones se utilizó el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), que permitió medir la correlación de los genes dentro de los individuos pertenecientes a las mismas subpoblaciones. Los valores  $F_{IS}$  obtenidos para cada localidad (Tabla 18) fueron altamente significativos, y nos indican que todas las localidades presentan un grado de endogamia. La localidad con menor valor de endogamia es Cerro Tijeretas (CT) ( $F_{IS} = 0.066$ ), mientras que la que mayor valor presentó fue Puerto Chino (PCh) ( $F_{IS} = 0.277$ ). Al analizar cada loci, se pudo ver que cinco loci (Mic01, Mic05, Mic06, Mic11 y Mic12) presentan un exceso de heterocigotos, mientras que los loci restantes están pasando por un exceso de homocigotos (Tabla 10), esto podría deberse a un reciente cuello de botella y a endogamia. Hay que tener presente que estos valores  $F_{IS}$  pueden deberse también a la naturaleza de esta especie, de que aquellos machos que presenten un mayor “display” serán los que pasen sus genes a la siguiente generación (selección sexual), y a los harems poligínicos (Ross 2001; SUGG *et al.* 1996). Por otro lado al analizar los valores obtenidos para el índice de Garza-Williamson (2001), para poder inferir si las localidades han pasado por un cuello



de botella, podemos observar que las medias se encuentran entre 0.291 (BRB) y 0.316 (PO), lo que nos puede llevar a inferir que no existe la posibilidad de cuellos de botella, o que estos hayan ocurrido hace algún tiempo ya que valores cercanos a cero nos indican la ocurrencia de un cuello de botella (BALLOUX and LUGON-MOULIN 2002; EXCOFFIER and HECKEL 2006; FRANKHAM *et al.* 2002; FREELAND 2005).

Las medidas de diferenciación ( $F_{ST}$ ,  $G'_{ST}$  y  $D$ ) nos expresan la proporción de la diversidad genética, debido a las diferencias en las frecuencias de alelos entre las poblaciones-localidades (NEI and CHESSEY 1983; ROUSSET 1997). Los resultados obtenidos para el análisis entre pares de localidades fueron altamente significativos (Tablas 11 - 13), nos indican una diferenciación que varía desde pequeña, entre las localidades PP - BRB pertenecientes al nororiente de la isla, PCh - PO pertenecientes al suroccidente de la isla, CT - LLb pertenecientes ambas a la localidad Puerto Baquerizo Moreno (PBM). Aunque la diferenciación también fue baja entre PP - LLb y PP - CT. Observando las distancias geográficas entre estos pares de localidades (tabla 16), podemos decir que existe mayor diferenciación entre las localidades CT - LLb, con una distancia geográfica (DG) entre ellas de 4 kilómetros, que entre las localidades pertenecientes a de PP - BRB, con una DG de 28.4 km. Una diferenciación moderada entre localidad BRB con las localidades pertenecientes a PBM (CT y LLb). Así también se pudo observar una diferenciación moderada entre la localidad LLb y las pertenecientes al suroccidente de la isla (PCh y PO). Una diferenciación grande se ve entre las localidades del nororiente de la isla (PP y BRB) y las pertenecientes al suroccidente (PCh y PO), así como entre CT - PCh. Estos valores se

correlacionan con los valores obtenidos para el número de migrantes (tabla 19), ya que entre las localidades que menor diferenciación se observó, se presentan los valores más altos de número de migrantes, lo que estaría en concordancia con los resultados obtenidos por Valle y colaboradores en el estudio de territorialidad de *M. bivittatus* en la isla San Cristóbal (datos sin publicar, con. pers.). Al realizar análisis de coordenadas principales (PCoA) con las distintas medidas de diferenciación (figuras 6 - 10), pudimos observar que el primer eje nos separa las localidades pertenecientes al suroccidente de la isla de las otras localidades (nororiente y PBM), mientras que el segundo eje nos separa las localidades pertenecientes al nororiente (BRB y PP) de las localidades pertenecientes a Puerto Baquerizo Moreno (PBM). A su vez este eje nos separa las localidades del PO (occidente) de PCh (oriente). Aunque en la mayoría de análisis de coordenadas principales se ve una tendencia a agruparse, al realizar una correlación entre las distancias genéticas y las geográficas (Test de Mantel) ninguna fue significativa y todos los valores de correlación ( $R_{xy}$ ) fueron negativos. Esto nos sugiere que no existe aislamiento entre las localidades y que el flujo génico entre las mismas es alto. Teniendo en cuenta los parámetros planteados por Levins (1969) para que se pueda hablar de metapoblaciones, la especie *M. bivittatus* en la isla San Cristóbal debe ser tratada como tal, ya que la distribución en anillo alrededor de la zona costera de la isla, y la posibilidad de que existan parches no ideales-habitables en esta distribución, junto a los valores obtenidos para la diferenciación genética, que nos indican un alto flujo génico, nos empujan a decir que el tipo de metapoblación que presenta es en mosaico (GAGGIOTTI 2003; GAGGIOTTI *et al.* 2009; HANSKI and GAGGIOTTI 2004).

Al analizar las muestras de individuos como una sola población (figuras 3 - 5), podemos observar que existe un cierto grado de agrupación entre los individuos pertenecientes a las localidades Puerto Chino (PCh) y Playa Ochoa (PO), del sur de la isla, y entre las localidades de Punta Pitt (PP) y Bahía Rosa Blanca (BRB), del norte de la isla. Mientras que las localidades de Cerro Tijeretas (CT) y La Lobería (LLb), que corresponden a la localidad Puerto Baquerizo Moreno (PBM) se encuentran repartidas en ambas agrupaciones. Al realizar el Test de Mantel con la distancia "Allele Sharing" y las distancias geográficas de cada individuo, se observó que existe una correlación negativa ( $R_{xy} = -0.284$ ) altamente significativa ( $P < 0.001$ ). Por esta razón para los análisis moleculares de la varianza (AMOVA) se agruparon de dos tipos, "norte-PBM-sur" y "este-oeste-PBM". En el AMOVA se encontró que todas las pruebas de diferenciación para los niveles jerárquicos fueron altamente significativas, encontrándose una mayor diferenciación dentro de los individuos (72.63 %,  $F_{IS} = 0.17378$ ,  $P < 0.001$ ), seguida por la variación entre los individuos dentro de las localidades (15.28 %,  $F_{SC} = 0.02926$ ,  $P < 0.001$ ); después la variación entre grupos (9.45%,  $F_{IT} = 0.27373$ ,  $P < 0.001$ ), finalmente la variación entre las localidades dentro de los grupos (2,65 %,  $F_{CT} = 0.09447$ ,  $P < 0.001$ ) cuando se agrupan las localidades en "Norte, Puerto Baquerizo Moreno y Sur". Mientras que al agrupar las localidades en "Este, Puerto Baquerizo Moreno y Oeste" no se encontró diferencias estadísticas significativas entre grupos (0 %,  $F_{IT} = 0.24751$ ,  $P < 0.001$ ) y la mayor variación se ve entre los individuos dentro de las localidades (64%,  $F_{SC} = 0.12204$ ,  $P < 0.001$ ), seguida por la variación dentro de los individuos (32 %,  $F_{IS} = 0.17378$ ,  $P < 0.001$ ), por último la variación entre localidades dentro de los grupos (4 %;  $F_{CT} = -0.03737$ ,  $P < 0.001$ ). No se encontró aislamiento por distancia, ya que el test de Mantel (1967) indicó que no hay

correlación significativa entre las matrices de divergencia genética y distancias geográficas entre pares de localidades.

## LITERATURA CITADA

- BALLOUX, F., and N. LUGON-MOULIN, 2002 The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**: 155-165.
- BEKKEVOLD, D., C. ANDRE, T. G. DAHLGREN, L. A. W. CLAUSEN, E. TORSTENSEN *et al.*, 2005 Environmental correlates of population differentiation in Atlantic Herring. *Evolution* **59**: 2656-2668.
- BENAVIDES, E., R. BAUM, D. MCCLELLAN and J. W. SITES, JR., 2007 Molecular phylogenetics of the lizard genus *Microlophus* (Squamata: Tropicuridae): Aligning and retrieving indel signal from nuclear introns. *Systematic Biology* **56**: 776-797.
- BENAVIDES, E., R. BAUM, H. M. SNELL, H. L. SNELL and J. W. SITES, JR., 2009 Island biogeography of Galápagos lava lizards (Tropicuridae: *Microlophus*): species diversity and colonization of the Archipiélago. *Evolution* **63**: 1606-1626.
- BENBOUZA, H., J.-M. JACQUEMIN, J.-P. BAUDOIN and G. MERGEAI, 2006 Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, Agronomie Société et Environnement* **10**: 77-81.
- CDF, and WWF, 2002 *Visión para la biodiversidad de las Islas Galápagos*, Puerto Ayora, Galápagos.
- COLINVAUX, P. A., and E. K. SCHOFIELD, 1976 Historical Ecology in the Galapagos Islands: I. A Holocene Pollen Record from El Junco Lake, Isla San Cristobal. *The Journal of Ecology* **64**: 989-1012.
- CRAWFORD, N. G., 2010 smogd: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources* **10**: 556-557.

- CRESTE, S., A. TULMANN-NETO and A. FIGUEIRA, 2001 Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 299-306.
- DEWOODY, J. A., and J. C. AVISE, 2000 Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* **56**: 461-473.
- EXCOFFIER, L., and G. HECKEL, 2006 Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat Rev Genet* **7**: 745-758.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL and S. SCHNEIDER, 2005 Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- EXCOFFIER, L., and H. E. L. LISCHER, 2010 Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564-567.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU and D. A. BRISCOE, 2002 *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, New York.
- FREELAND, J. R., 2005 *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- GAGGIOTTI, O. E., 2003 Genetic threats to population persistence. *Annales Zoologici Fennici* **40**: 155-168.
- GAGGIOTTI, O. E., D. BEKKEVOLD, H. B. H. JØRGENSEN, M. FOLL, G. R. CARVALHO *et al.*, 2009 Disentangling the effects of evolutionary, demographic, and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic Herring as a case study. *Evolution* **63**: 2939-2951.
- GARZA, J. C., and E. G. WILLIAMSON, 2001 Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* **10**: 305-318.
- GEIST, D., T. NAUMANN and P. LARSON, 1998 Evolution of Galápagos Magmas: Mantle and Crustal Fractionation without Assimilation. *Journal of Petrology* **39**: 953-971.
- GERLACH, G., A. JUETERBOCK, P. KRAEMER, J. DEPPERMANN and P. HARMAND, 2010 Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! *Molecular Ecology* **19**: 3845-3852.

- GOUDET, J., 1995 FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* **86**: 485-486.
- GUO, S. W., and E. A. THOMPSON, 1992 Performing the exact test of Hardy\_Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**: 361-372.
- HALDANE, J. B. S., 1954 An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics* **52**: 631-635.
- HANSKI, I., and O. E. GAGGIOTTI (Editors), 2004 *Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations*. Elsevier Inc., Oxford.
- HEDRICK, P. W., 1999 Perspective: Highly Variable Loci and Their Interpretation in Evolution and Conservation. *Evolution* **53**: 313-318.
- HEDRICK, P. W., 2005 A STANDARDIZED GENETIC DIFFERENTIATION MEASURE. *Evolution* **59**: 1633-1638.
- HELLER, R., and H. R. SIEGISMUND, 2009 Relationship between three measures of genetic differentiation GST, DEST and G'ST: how wrong have we been? *Molecular Ecology* **18**: 2080-2083.
- JIMÉNEZ-UZCATEGUI, G., C. MÁRQUEZ and H. L. SNELL, 2011 CDF Checklist of Galapagos Reptiles - FDC Lista de especies de Reptiles de Galápagos pp. in *Charles Darwin Foundation Galapagos Species Checklist - Lista de Especies de Galápagos de la Fundación Charles Darwin.*, edited by C. D. FOUNDATION. Charles Darwin Foundation, Puerto Ayora.
- JOLLIFFE, I. T., 2002 *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, New York, USA.
- JONES, M. E., D. PAETKAU, E. GEFFEN and C. MORITZ, 2004 Genetic diversity and population structure of Tasmanian devils, the largest marsupial carnivore. *Molecular Ecology* **13**: 2197-2209.
- JORDAN, M. A., R. L. HAMMOND, H. L. SNELL, H. M. SNELL and C. JORDAN, 2002 Isolation and characterization of microsatellite loci from Galápagos lava lizards (*Microlophus* spp.). *Molecular Ecology Notes* **2**: 349-351.
- JORDAN, M. A., and H. L. SNELL, 2008 Historical fragmentation of islands and genetic drift in populations of Galápagos lava lizards (*Microlophus albemarlensis* complex). *Molecular Ecology* **17**: 1224-1237.

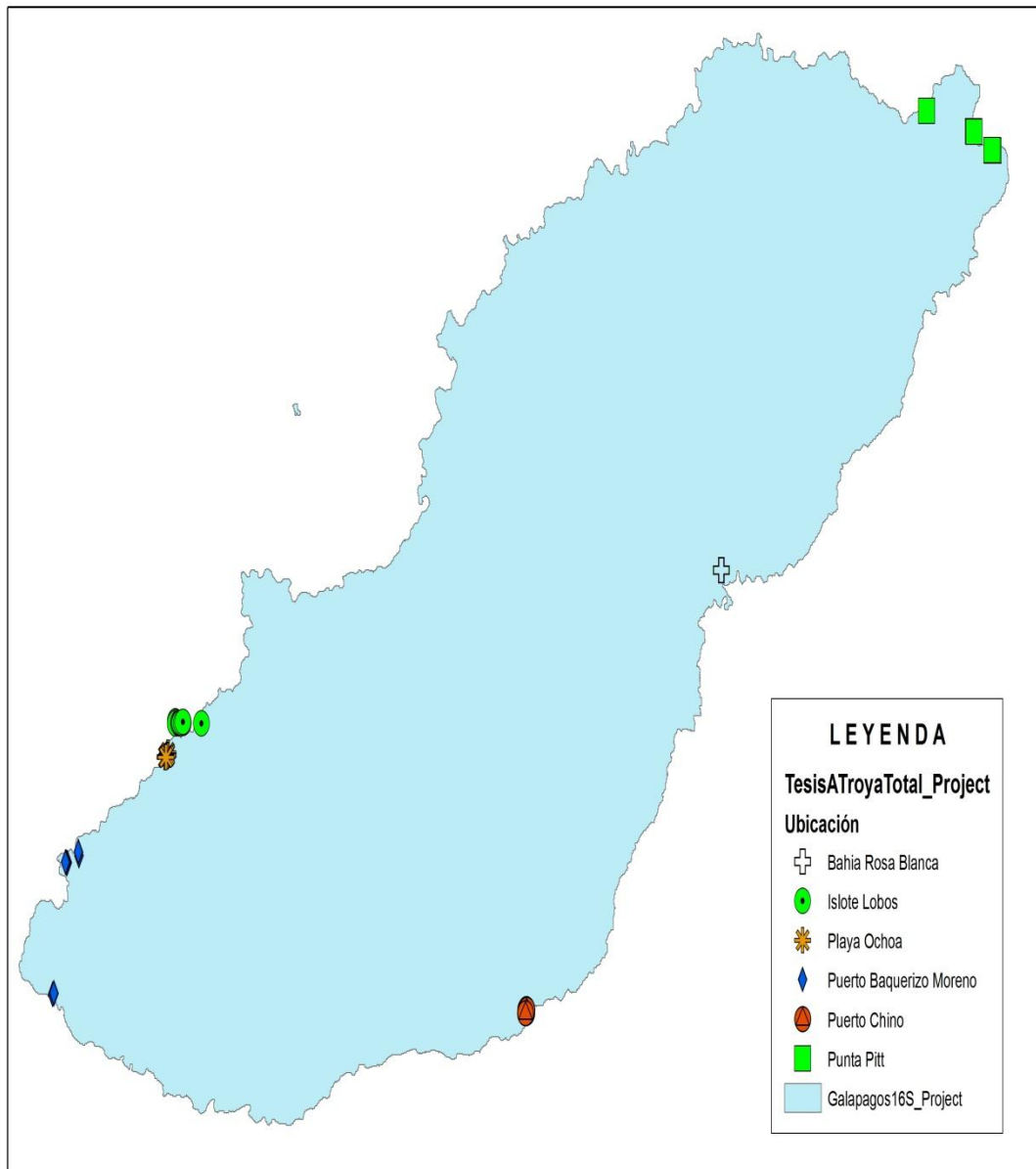
- JØRGENSEN, H. B. H., M. M. HANSEN, D. BEKKEVOLD, D. E. RUZZANTE and V. LOESCHCKE, 2005 Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology* **14**: 3219-3234.
- JOST, L. O. U., 2008 GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* **17**: 4015-4026.
- JOST, L. O. U., 2009 D vs. GST: Response to Heller and Siegismund (2009) and Ryman and Leimar (2009). *Molecular Ecology* **18**: 2088-2091.
- KIZIRIAN, D., A. TRAGER, M. A. DONNELLY and J. W. WRIGHT, 2004 Evolution of Galápagos Islands lava lizards (Iguania: Tropiduridae: *Microlophus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 761-769.
- KREBS, C. J., 1972 *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. Harper & Row, Publishers.
- LEVINS, R., 1969 Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America* **15**: 237-240.
- LOWE, A., S. HARRIS and P. ASHTON, 2004 *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Publishing, Oxford.
- MANTEL, N., 1967 The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- MILES, D. B., H. L. SNELL and H. M. SNELL, 2001 Intrapopulation variation in endurance of Galápagos lava lizards (*Microlophus albemarlensis*): evidence for an interaction between natural and sexual selection. *Evolutionary Ecology Research* **3**: 795-804.
- NEFF, B. D., and M. R. GROSS, 2001 MICROSATELLITE EVOLUTION IN VERTEBRATES: INFERENCE FROM AC DINUCLEOTIDE REPEATS. *Evolution* **55**: 1717-1733.
- NEI, M., 1972 Genetic Distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-292.
- NEI, M., 1987 *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- NEI, M., and R. K. CHESSEY, 1983 Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics* **47**: 253-259.

- NEIGEL, J. E., 2002 Is FST obsolete? *Conservation genetics* **3**: 167-173.
- PEAKALL, R. O. D., and P. E. SMOUSE, 2006 genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288-295.
- PÉREZ, J., and K. BALTA, 2007 Ecology of the diurnal lizards community in the Reserva Nacional de Paracas, Ica, Peru. *Revista peruana de biología* **13**: 169-176.
- PÉREZ Z., J., and K. BALTA, 2007 Ecology of the diurnal lizards community in the Reserva Nacional de Paracas, Ica, Peru. *Revista peruana de biología* **13**: 169-176.
- QUISPIÚPAC, E., and J. PÉREZ, 2009 Diet of the beach lizard *Microlophus peruvianus* (Reptilia : Tropiduridae) in the Santo Domingo beach, Ica, Peru. *Revista peruana de biología* **15**: 129-130.
- RAMÍREZ, C., J. GONZALES, J. PINO and B. SHIGA, 2007 Observaciones morfohistológicas del testículo y espermatozoides de *Microlophus peruvianus* (Lesson, 1826) (Sauria:Tropiduridae). *Rev. peru. biol.* **13**: 259-261.
- RAYMOND, M., and F. ROUSSET, 1995a An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**: 1280-1283.
- RAYMOND, M., and F. ROUSSET, 1995b GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248-249.
- ROSS, K. G., 2001 Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology* **10**: 265-284.
- ROUSSET, F., 1997 Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**: 1219-1228.
- RYMAN, N., and O. LEIMAR, 2009 GST is still a useful measure of genetic differentiation — a comment on Jost's D. *Molecular Ecology* **18**: 2084-2087.
- SLATKIN, M., 1985 Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 393-430.
- SNELL, H. L., H. M. SNELL and S. HARCOURT, 1988 Intrapopulation variation in predator-avoidance performance of Galapagos lava lizards: the interaction of sexual and natural selection. *Evolutionary Ecology* **2**: 353-369.

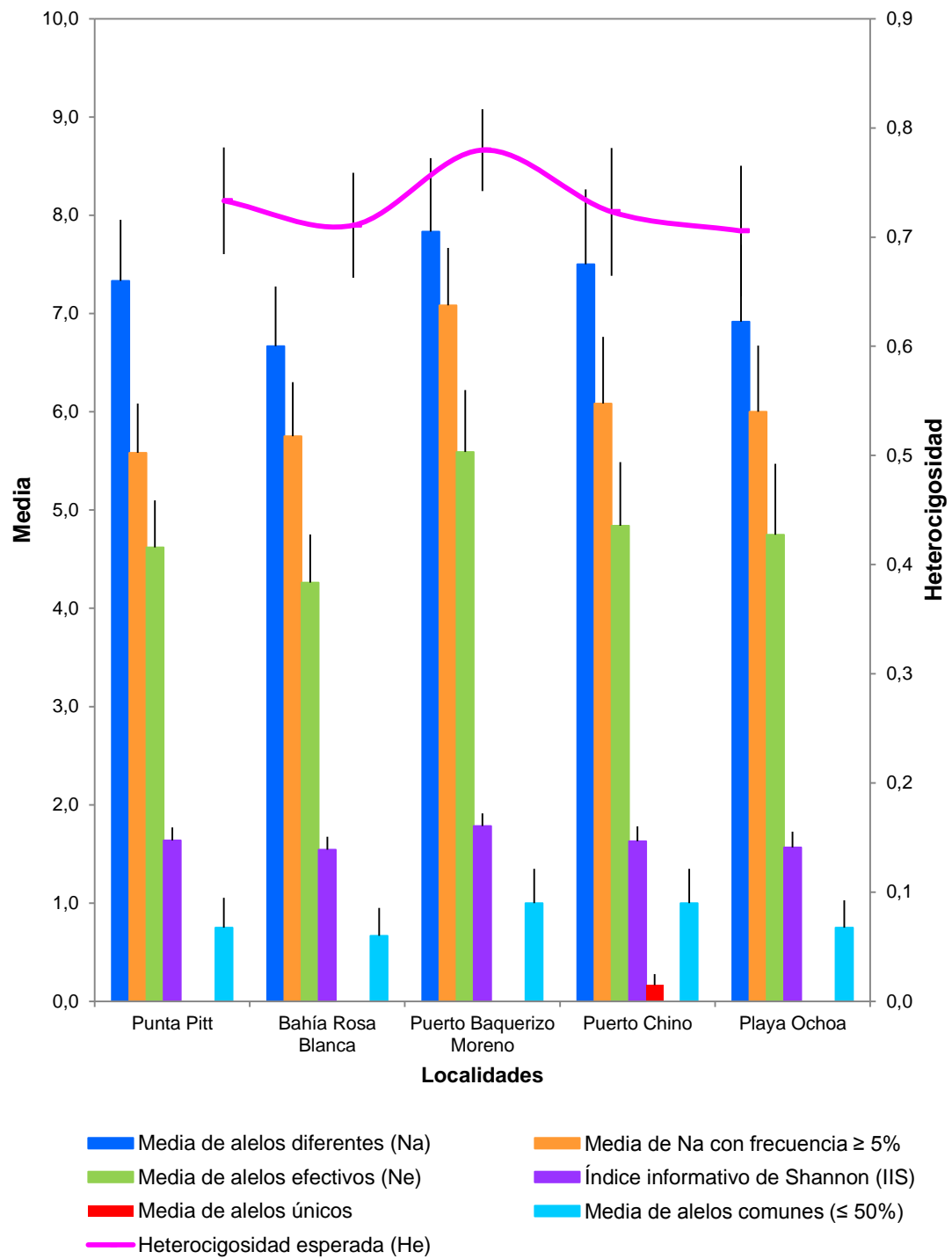


- SNELL, H. M., P. A. STONE and H. L. SNELL, 1996 A summary of geographical characteristics of the Galapagos Islands. *Journal of Biogeography* **23**: 619-624.
- SUGG, D. W., R. K. CHESSER, F. STEPHEN DOBSON and J. L. HOOGLAND, 1996 Population genetics meets behavioral ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 338-342.
- VIDAL, M., J. C. ORTÍZ and A. LABRA, 2002 Sexual and age differences in ecological variables of the lizard *Microlophus atacamensis* (Tropiduridae) from northern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* **75**: 283-292.
- WEIR, B. S., 1996 *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- WEIR, B. S., and C. C. COCKERHAM, 1984 Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- WHITLOCK, M. C., 2011 and D do not replace FST. *Molecular Ecology* **20**: 1083-1091.
- WRIGHT, J. W., 1983 The evolution and biogeography of the lizards of the Galapagos Archipelago: evolutionary genetics of *Phyllodactylus* and *Tropidurus* populations, pp. 123–155 in *Patterns of Evolution in Galapagos Organisms*, edited by R. I. BOWMAN and E. AL., San Francisco, USA.
- WRIGHT, J. W., 1984 The origin and evolution of lizards of the Galapagos Islands. *Terra* **1984**: 21–27.

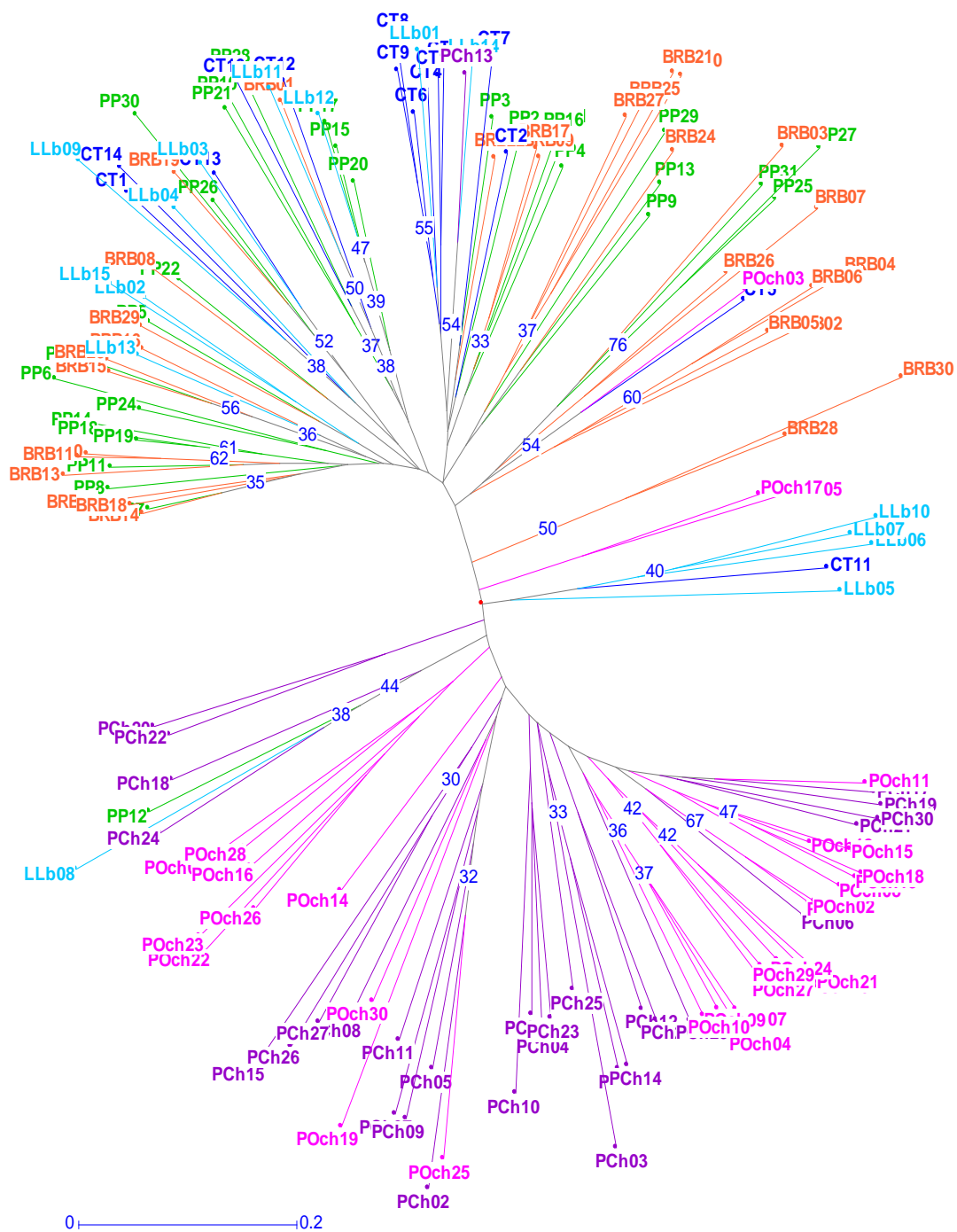
## FIGURAS



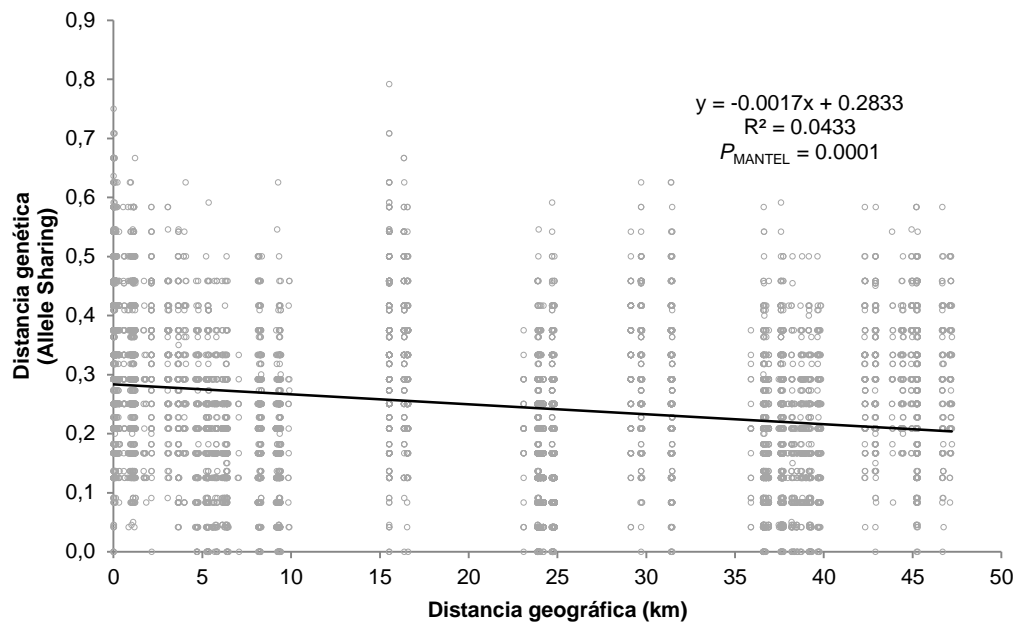
**Figura 1.** Mapa de las localidades analizadas en la Isla San Cristóbal e Isote Lobos.



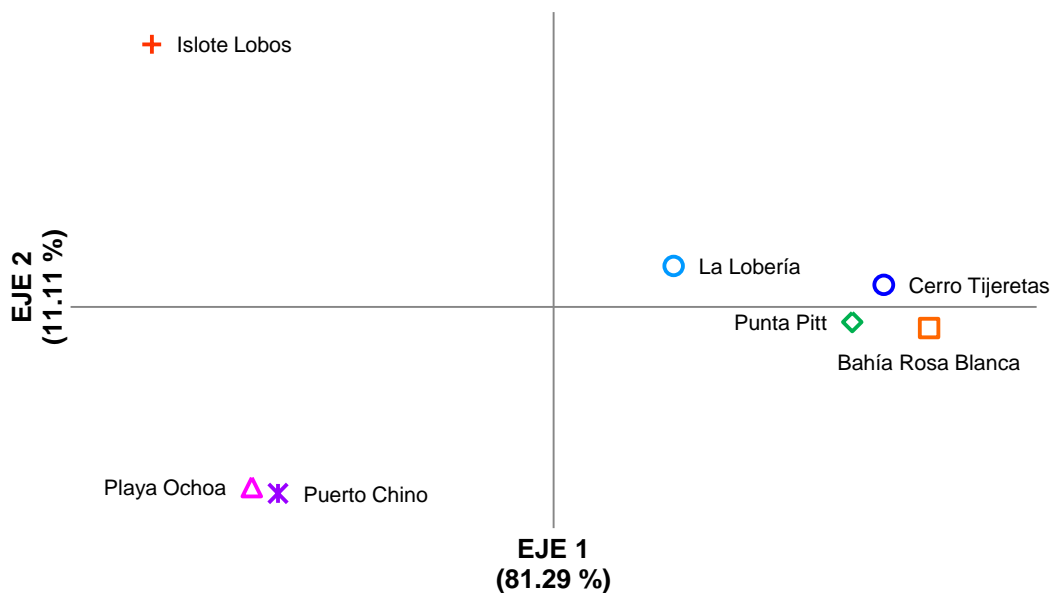
**Figura 2.** Patrones alélicos a través de las localidades analizadas.



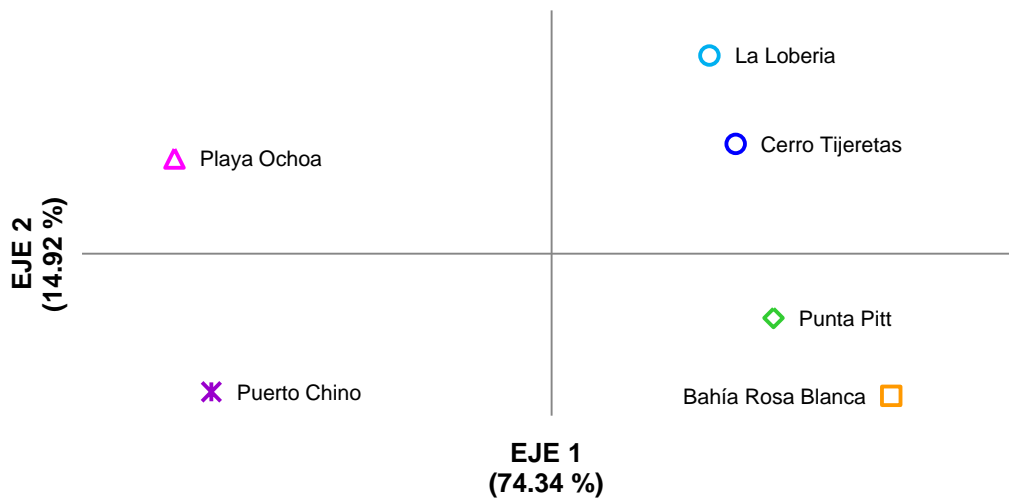
**Figura 3.** Análisis de agrupamiento “Neighbor Joinig” utilizando la distancia “simple matching” (bootstrap 1000).



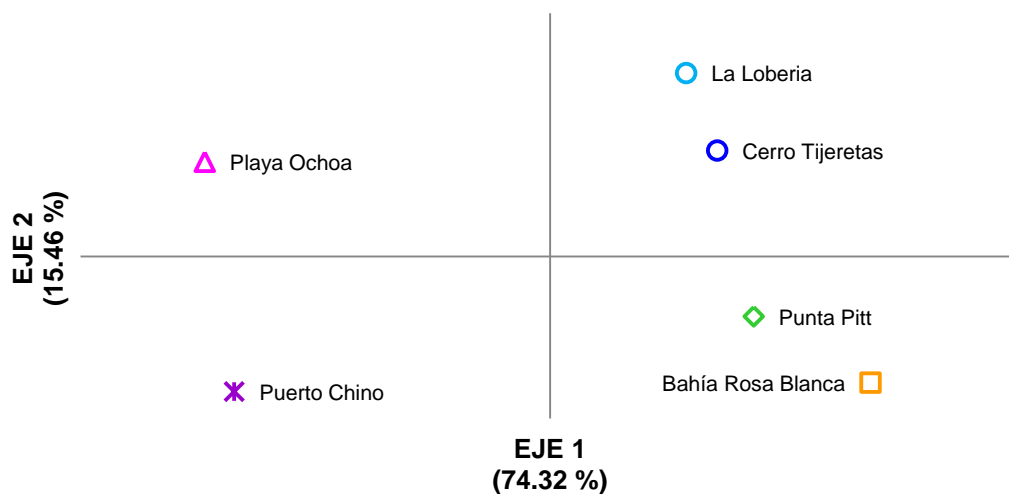
**Figura 4.** Prueba de Mantel entre las distancias geográficas y la distancia “Allele Sharing” de los individuos ( $R_{xy} = -0.284$ ).



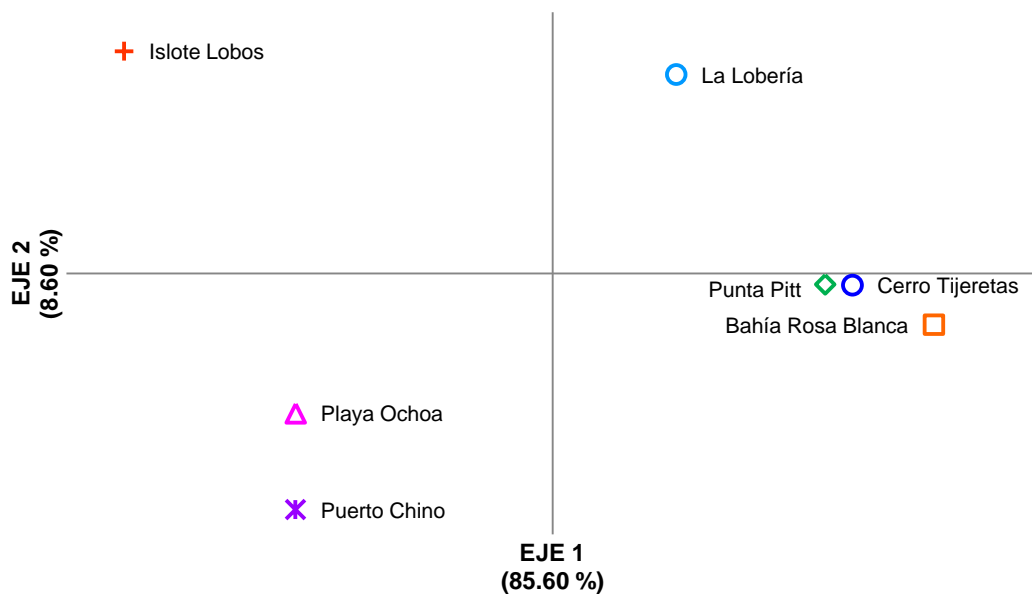
**Figura 5.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham 1984) por pares de localidades.



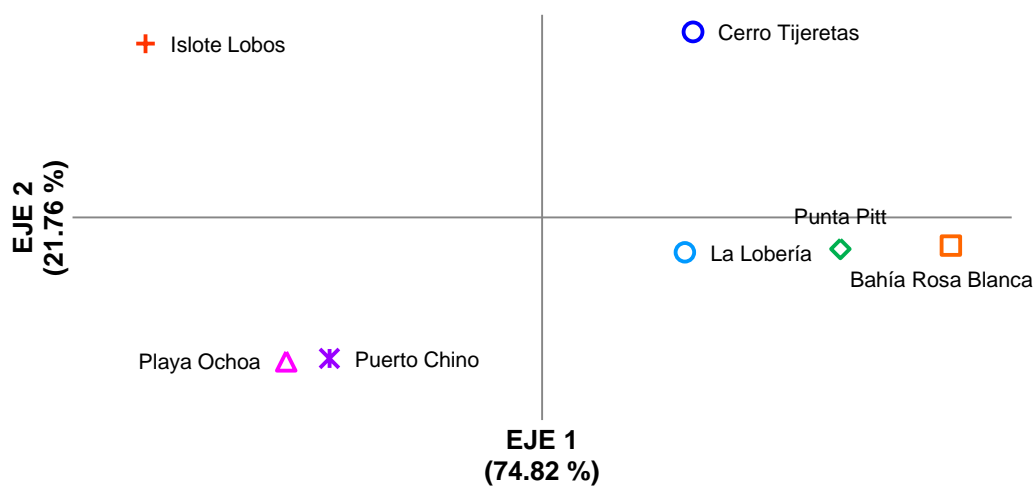
**Figura 6.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de  $G'ST$  (Hedrick 2005) por pares de localidades.



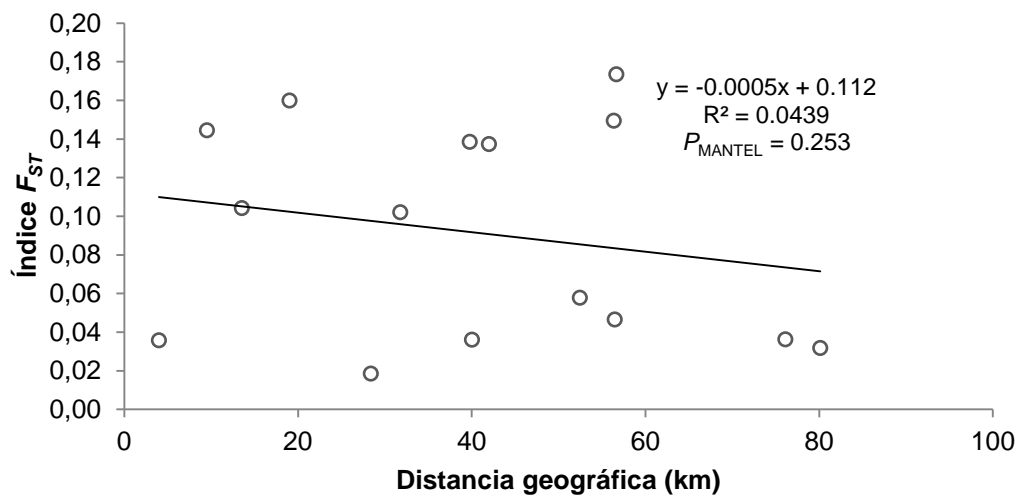
**Figura 7.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de  $D$  (Jost 2009) por pares de localidades.



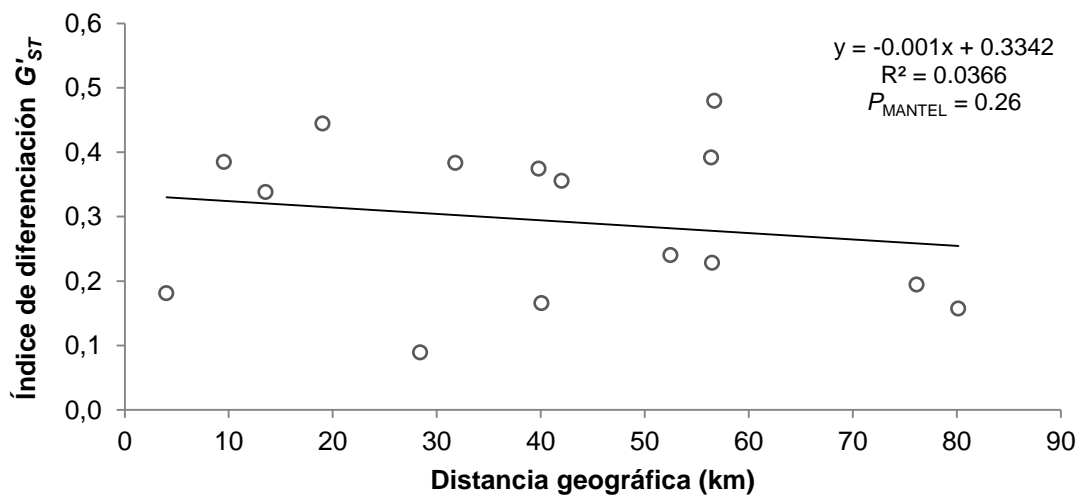
**Figura 8.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de Nei (1972).



**Figura 9.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con la matriz de Slatkin (1985).

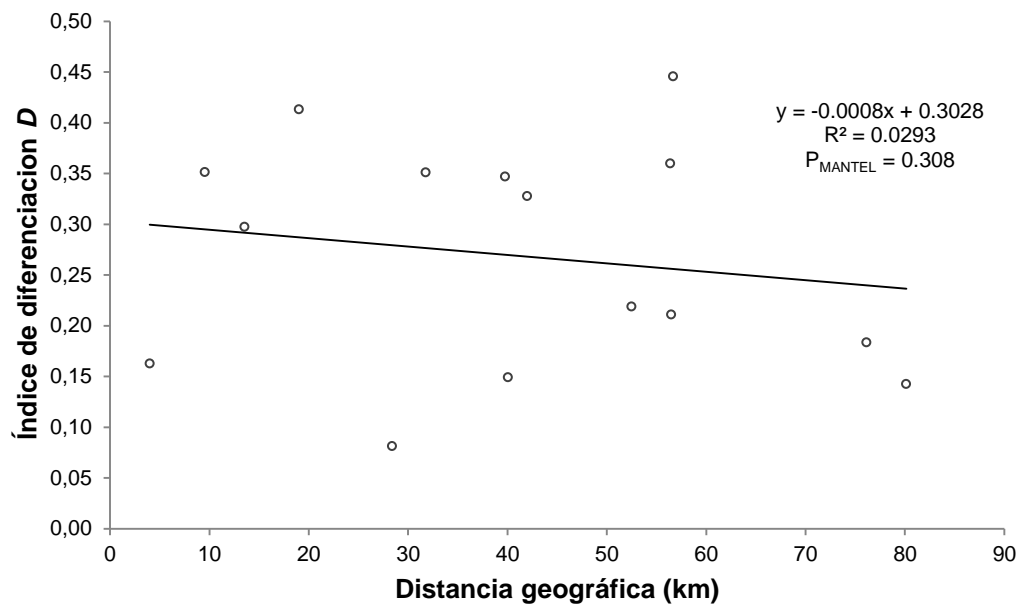


**Figura 10.** Test de Mantel entre el índice  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham 1984) y distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = -0.253$ ).

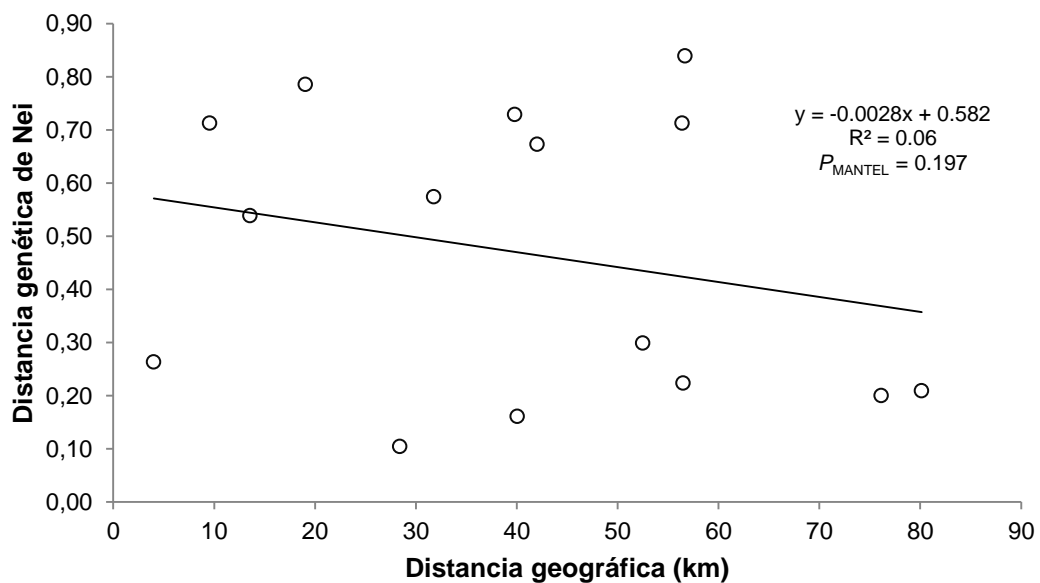


**Figura 11.** Test de Mantel entre el índice  $G'_{ST}$  (Hedrick 2005) y distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = -0.191$ ).

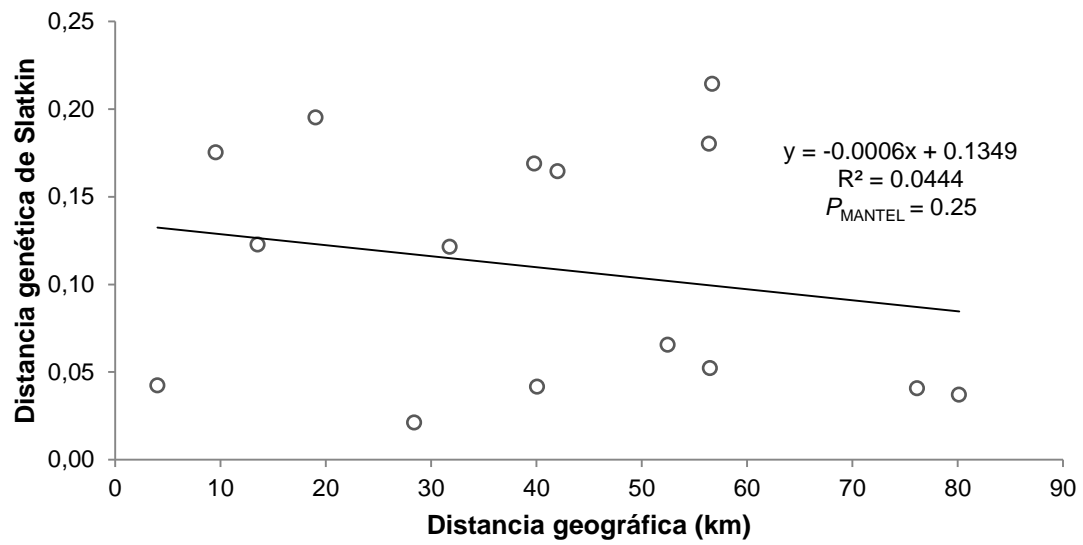




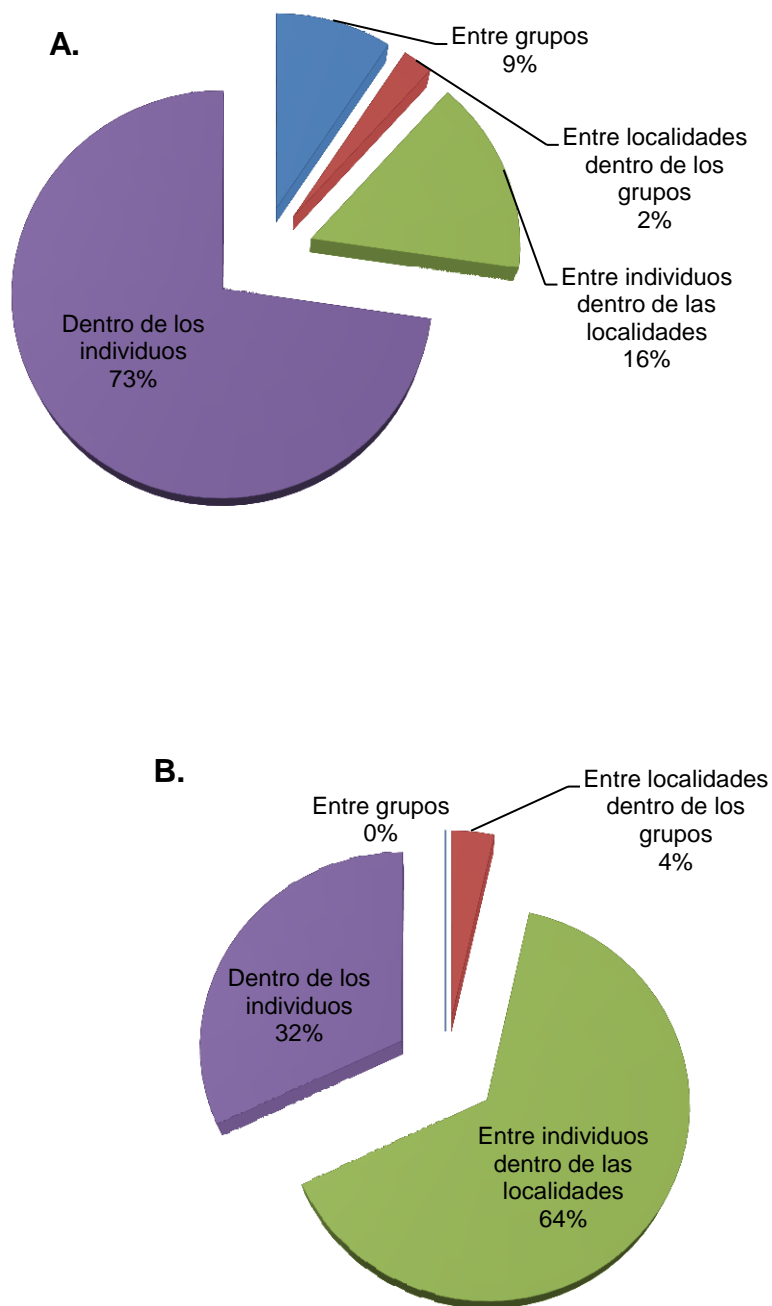
**Figura 12.** Test de Mantel entre el índice  $D$  (Jost 2009) y las distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = -0.171$ ).



**Figura 13.** Test de Mantel entre la distancia genética de Nei (1972) y las distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = -0.245$ ).



**Figura 14.** Test de Mantel entre la distancia genética de Slatkin (1985) y las distancias geográficas (km) ( $R_{xy} = -0.211$ ).



**Figura 15.** Porcentajes de la variación de *M. bivittatus* en la Isla San Cristóbal explicado en el AMOVA. A: grupos “norte - PBM - sur”; B : grupo “este - oeste - PBM”.

## TABLAS

**Tabla 1.** Número de alelos y número de alelos únicos muestreados por locus y población, obtenido con los programas Fstat y GenAlEx.

	LOCALIDAD							Total	Alelos únicos
	PP	BRB	PBM	PCh	PO	IsLs			
<b>LOCUS</b>	Mic01	9	8	10	9	10	7	10	0
	Mic02	10	9	9	8	8	4	10	0
	Mic03	10	10	13	12	11	6	13	0
	Mic04	10	5	9	11	10	9	11	2
	Mic05	8	9	9	8	7	3	9	0
	Mic06	6	6	6	7	4	4	7	2
	Mic07	7	7	9	9	8	4	9	0
	Mic08	6	5	6	5	6	4	6	1
	Mic09	4	4	4	3	2	3	4	1
	Mic10	7	5	7	7	7	4	7	0
	Mic11	4	4	4	4	4	3	4	0
	Mic12	7	8	8	7	6	3	8	0
<b>Total</b>	88	80	94	90	83	54	98	6	
<b>Alelos únicos</b>	0	0	0	2	0	4	6		
<b>Diversidad alélica (A)</b>	7.333	6.667	7.833	7.500	6.917	4.500	8.500		
<b>Desviación estándar de A</b>	2.146	2.103	2.588	2.646	2.712	1.883	2.611		

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

**Tabla 2.** Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) por locus y población, obtenido con los programas Arlequin, Fstat y GenAlEx.

LOCUS	LOCALIDAD													
	PP		BRB		PBM		PCh		PO		IsLs		Media	
	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$
Mic01	0.79	0.86	0.97	0.85	0.90	0.89	0.80	0.86	0.87	0.90	0.89	0.83	0.87	0.86
Mic02	0.58	0.81	0.63	0.86	0.53	0.87	0.60	0.54	0.87	0.73	0.90	0.60	0.69	0.73
Mic03	0.84	0.86	0.87	0.87	0.80	0.91	0.77	0.91	0.80	0.90	0.72	0.63	0.80	0.85
Mic04	0.42	0.86	0.57	0.70	0.45	0.87	0.43	0.86	0.72	0.86	0.33	0.82	0.49	0.83
Mic05	0.94	0.79	0.63	0.82	0.93	0.85	0.37	0.76	0.27	0.46	0.20	0.62	0.56	0.72
Mic06	0.65	0.63	0.77	0.66	0.73	0.66	0.60	0.85	0.37	0.71	0.47	0.71	0.60	0.70
Mic07	0.45	0.80	0.63	0.79	0.60	0.84	0.70	0.86	0.63	0.86	0.53	0.73	0.59	0.81
Mic08	0.61	0.82	0.53	0.80	0.63	0.83	0.48	0.74	0.50	0.80	0.60	0.71	0.56	0.78
Mic09	0.19	0.26	0.20	0.30	0.17	0.44	0.10	0.16	0.13	0.18	0.43	0.40	0.20	0.29
Mic10	0.55	0.83	0.47	0.76	0.47	0.84	0.31	0.82	0.57	0.84	0.43	0.73	0.47	0.80
Mic11	0.83	0.63	0.57	0.50	0.93	0.70	0.57	0.71	0.60	0.65	0.73	0.58	0.71	0.63
Mic12	0.94	0.81	0.60	0.78	0.93	0.81	0.63	0.77	0.60	0.73	0.40	0.63	0.68	0.75
<b>Media</b>	0.65	0.73	0.62	0.71	0.67	0.78	0.53	0.72	0.58	0.71	0.55	0.67	0.60	0.73

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

**Tabla 3.** Diversidad génica (Nei 1987) por locus y población, obtenido con los programas Fstat y Arlequin.

		LOCALIDAD						
		PP	BRB	PBM	PCh	PO	IsLs	Total
<b>LOCUS</b>	Mic01	0.859	0.845	0.892	0.86	0.898	0.844	0.871
	Mic02	0.81	0.86	0.878	0.541	0.729	0.605	0.764
	Mic03	0.86	0.869	0.91	0.91	0.905	0.643	0.891
	Mic04	0.87	0.698	0.877	0.862	0.858	0.844	0.833
	Mic05	0.786	0.823	0.85	0.764	0.46	0.64	0.737
	Mic06	0.628	0.66	0.657	0.853	0.714	0.725	0.702
	Mic07	0.801	0.791	0.845	0.867	0.867	0.751	0.834
	Mic08	0.823	0.801	0.832	0.745	0.801	0.719	0.8
	Mic09	0.264	0.297	0.449	0.16	0.184	0.401	0.271
	Mic10	0.838	0.769	0.844	0.826	0.849	0.745	0.825
	Mic11	0.622	0.497	0.698	0.71	0.646	0.587	0.635
	Mic12	0.805	0.785	0.81	0.77	0.73	0.646	0.78
	<b>Media</b>	0.747	0.725	0.795	0.739	0.72	0.677	0.8109
	<b>Desviación estándar (sd)</b>	0.0496	0.049	0.0382	0.0595	0.0608	0.035	0.0271

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

**Tabla 4.** Riqueza alélica por locus y población en función del tamaño mínimo de muestra de: 28 individuos diploides, obtenido con el programa Fstat.

		LOCALIDAD						Total	Media
		PP	BRB	PBM	PCh	PO	IsLs		
<b>LOCUS</b>	Mic01	9.00	8.00	9.97	9.00	10.00	7.00	9.86	9.19
	Mic02	9.80	8.93	9.00	7.86	7.93	3.90	9.58	8.70
	Mic03	9.89	9.93	12.92	12.00	10.87	5.93	11.98	11.12
	Mic04	9.89	5.00	8.97	10.79	9.96	8.89	10.31	8.92
	Mic05	7.98	9.00	9.00	7.99	6.99	3.00	8.84	8.19
	Mic06	5.90	6.00	6.00	7.00	4.00	4.00	6.67	5.78
	Mic07	7.00	7.00	9.00	8.87	8.00	4.00	8.90	7.97
	Mic08	6.00	5.00	6.00	5.00	6.00	4.00	6.00	5.60
	Mic09	3.90	3.93	3.93	3.00	2.00	3.00	3.54	3.35
	Mic10	7.00	5.00	7.00	6.97	6.93	4.00	6.97	6.58
	Mic11	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	3.00	4.00	4.00
	Mic12	7.00	8.00	8.00	7.00	5.93	3.00	7.96	7.18
<b>Total</b>		87.37	79.77	93.78	89.47	82.62	53.72	94.607	
<b>Riqueza alélica (I)</b>		7.28	6.65	7.82	7.46	6.89	4.48	7.884	

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

**Tabla 5.** Valores obtenidos para el índice de Garza-Williamson (2001), obtenido con el programa Arlequin.

	LOCALIDAD						Desviación		
	PP	BRB	PBM	PCh	PO	IsLs	Media	estándar (sd)	
LOCUS	Mic01	0.391	0.348	0.435	0.429	0.435	0.368	0.407	0.034
	Mic02	0.370	0.360	0.333	0.348	0.348	0.308	0.352	0.013
	Mic03	0.213	0.233	0.255	0.255	0.216	0.118	0.234	0.018
	Mic04	0.204	0.122	0.184	0.169	0.204	0.184	0.177	0.030
	Mic05	0.258	0.290	0.290	0.258	0.241	0.600	0.268	0.020
	Mic06	0.286	0.286	0.286	0.333	0.190	0.190	0.276	0.047
	Mic07	0.304	0.304	0.333	0.333	0.296	0.148	0.314	0.016
	Mic08	0.240	0.217	0.240	0.200	0.240	0.235	0.227	0.016
	Mic09	0.364	0.364	0.364	0.429	0.667	0.600	0.437	0.117
	Mic10	0.333	0.238	0.333	0.333	0.333	0.364	0.314	0.038
	Mic11	0.308	0.308	0.308	0.308	0.308	0.231	0.308	0.000
	Mic12	0.368	0.421	0.421	0.368	0.316	0.273	0.379	0.039
	<b>Media</b>	0.303	0.291	0.315	0.314	0.316	0.302	0.308	0.010
	<b>Desviación estándar (sd)</b>	0.062	0.077	0.069	0.077	0.125	0.153	0.082	0.022

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).



**Tabla 6.** Valores obtenidos para el coeficiente de endogamia - consanguinidad ( $F_{IS}$ ) de las localidades de *M. bivittatus* calculado en los programas Arlequin y GenePop.

	LOCALIDAD						Media ( $F_{IS}$ )
	PP	BRB	PBM	PCh	PO	IsLs	
Mic01	0.085	-0.144	-0.006	0.07	0.035	-0.053	-0.328
Mic02	0.283	0.264	0.393	-0.108	-0.189	-0.489	0.091
Mic03	0.024	0.003	0.121	0.158	0.116	-0.126	0.124
Mic04	0.518	0.188	0.489	0.497	0.156	0.605	0.193
Mic05	-0.19	0.23	-0.098	0.52	0.421	0.687	-0.268
LOCUS Mic06	-0.027	-0.161	-0.115	0.296	0.486	0.356	-0.119
Mic07	0.436	0.2	0.29	0.192	0.27	0.289	0.288
Mic08	0.255	0.334	0.238	0.352	0.375	0.165	0.273
Mic09	0.267	0.327	0.629	0.374	0.275	-0.08	0.292
Mic10	0.346	0.393	0.447	0.624	0.332	0.419	0.439
Mic11	-0.34	-0.141	-0.338	0.202	0.071	monomórfico	-0.138
Mic12	-0.162	0.236	-0.152	0.177	0.178	0.381	-0.053
<b><math>F_{IS}</math> TOTAL</b>	0.132	0.145	0.153	0.283	0.199	0.177	

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

**Tabla 7.** Índices de diferenciación genética  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham 1984) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa Arlequin.

	<b>PP</b>	<b>BRB</b>	<b>CT</b>	<b>LLb</b>	<b>PCh</b>	<b>PO</b>	<b>IsLs</b>
<b>PP</b>	0.000						
<b>BRB</b>	0.021	0.000					
<b>CT</b>	0.039	0.050	0.000				
<b>LLb</b>	0.036	0.062	0.041	0.000			
<b>PCh</b>	0.141	0.163	0.144	0.108	0.000		
<b>PO</b>	0.153	0.176	0.149	0.109	0.040	0.000	
<b>IsLs</b>	0.120	0.135	0.127	0.085	0.061	0.062	0.000

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs). Todos los valores obtenidos son altamente significativos ( $P < 0.01$ ).

**Tabla 8.** Índices de diferenciación genética  $G'_{ST}$  (Hedrick 2005) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa SMOGD.

	<b>PP</b>	<b>BRB</b>	<b>CT</b>	<b>LLb</b>	<b>PCh</b>	<b>PO</b>
<b>PP</b>	0.000					
<b>BRB</b>	0.089	0.000				
<b>CT</b>	0.195	0.228	0.000			
<b>LLb</b>	0.157	0.240	0.181	0.000		
<b>PCh</b>	0.355	0.444	0.375	0.384	0.000	
<b>PO</b>	0.392	0.480	0.385	0.338	0.166	0.000

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs). Todos los valores obtenidos son altamente significativos ( $P < 0.01$ ).

**Tabla 9.** Índices de diferenciación genética  $D$  (Jost 2009) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa SMOGD.

	<b>PP</b>	<b>BRB</b>	<b>CT</b>	<b>LLb</b>	<b>PCh</b>	<b>PO</b>
<b>PP</b>	0.000					
<b>BRB</b>	0.019	0.000				
<b>CT</b>	0.036	0.047	0.000			
<b>LLb</b>	0.032	0.058	0.036	0.000		
<b>PCh</b>	0.137	0.160	0.139	0.102	0.000	
<b>PO</b>	0.150	0.174	0.145	0.104	0.036	0.000

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs). Todos los valores obtenidos son altamente significativos ( $P < 0.01$ ).

**Tabla 10.** Distancia genética de Nei (1972) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa Genalex.

	<b>PP</b>	<b>BRB</b>	<b>CT</b>	<b>LLb</b>	<b>PCh</b>	<b>PO</b>	<b>IsLs</b>
<b>PP</b>	0.000						
<b>BRB</b>	0.104	0.000					
<b>CT</b>	0.200	0.224	0.000				
<b>LLb</b>	0.210	0.299	0.263	0.000			
<b>PCh</b>	0.673	0.786	0.729	0.575	0.000		
<b>PO</b>	0.713	0.839	0.713	0.539	0.161	0.000	
<b>IsLs</b>	0.864	1.020	0.916	0.605	0.347	0.341	0.000

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs). Todos los valores obtenidos son altamente significativos ( $P < 0.01$ ).

**Tabla 11.** Distancia genética de Slatkin (1985) por comparación entre pares de localidades obtenidas con el programa Arlequin.

	<b>PP</b>	<b>BRB</b>	<b>CT</b>	<b>LLb</b>	<b>PCh</b>	<b>PO</b>	<b>IsLs</b>
<b>PP</b>	0.000						
<b>BRB</b>	0.021	0.000					
<b>CT</b>	0.041	0.052	0.000				
<b>LLb</b>	0.037	0.066	0.042	0.000			
<b>PCh</b>	0.164	0.195	0.169	0.121	0.000		
<b>PO</b>	0.180	0.214	0.175	0.123	0.042	0.000	
<b>IsLs</b>	0.231	0.269	0.117	0.174	0.111	0.114	0.000

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

**Tabla 12.** Distancias geográficas (km) entre las seis localidades analizadas.

	<b>PP</b>	<b>BRB</b>	<b>CT</b>	<b>LLb</b>	<b>PCh</b>	<b>PO</b>	<b>IsLs</b>
<b>PP</b>	0.000						
<b>BRB</b>	28.40	0.000					
<b>CT</b>	76.14	56.48	0.000				
<b>LLb</b>	80.14	52.48	4.00	0.000			
<b>PCh</b>	42.00	19.03	39.78	31.78	0.000		
<b>PO</b>	56.38	56.68	9.54	13.54	40.06	0.000	
<b>IsLs</b>	58.77	61.06	10.85	14.85	41.2	1.88	0.000

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

**Tabla 13.** AMOVA de las localidades de *M. bivittatus* (grupos: norte - PBM - sur) calculado en el programa Arlequin.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componentes de variación</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
<b>Entre grupos</b>	2	114.567	0.47333 (Va)	9.45
<b>Entre localidades dentro de grupos</b>	3	35.556	0.13277 (Vb)	2.65
<b>Entre individuos dentro de localidades</b>	145	749.642	0.76544 (Vc)	15.28
<b>Dentro de individuos</b>	151	549.500	3.63907 (Vd)	72.63
<b>Total</b>	301	1449.265	5.01061	100

Índices de fijación:  $F_{IS} = 0.17378$  (Vd);  $F_{SC} = 0.02926$  (Vc);  $F_{CT} = 0.09447$  (Vb);  $F_{IT} = 0.27373$  (Va). Todos los valores fueron altamente significativos ( $P \leq 0.01$ ).

**Tabla 14.** AMOVA de las localidades de *M. bivittatus* (grupos: este - oeste) calculado en el programa Arlequin.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componentes de variación</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
<b>Entre grupos</b>	1	11.217	-0.18071 (Va)	0
<b>Entre localidades dentro de grupos</b>	4	138.906	0.61224 (Vb)	4
<b>Entre individuos dentro de localidades</b>	145	749.642	0.76544 (Vc)	32
<b>Dentro de individuos</b>	151	549.500	3.63907 (Vd)	64
<b>Total</b>	301	1449.265	4.85781	100

Índices de fijación:  $F_{IS} = 0.17378$  (Vd);  $F_{SC} = 0.12204$  (Vc);  $F_{CT} = -0.03737$  (Vb);  $F_{IT} = 0.24751$  (Va). Todos los valores fueron altamente significativos ( $P \leq 0.01$ ).

**Tabla 15.** Índice  $F_{IS}$  específicos para cada localidad (1023 permutaciones), calculado en el programa Arlequin.

<b>Localidad</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b>Valor <math>P</math></b>	<b>Significancia</b>
Punta Pitt	0.124	0.000	***
Bahía Rosa Blanca	0.145	0.000	***
Cerro Tijeretas	0.066	0.095	***
La Lobería	0.191	0.000	***
Puerto Chino	0.277	0.000	***
Playa Ochoa	0.196	0.000	***
Islote Lobos	0.177	0.000	***
<b>Total</b>	<b>0.036</b>	<b>0.010</b>	<b>***</b>

Valor  $P$  (Rand  $F_{IS} \geq$  Obs  $F_{IS}$ )

**Tabla 16.** Valores de  $Nm$  entre localidades de *M. bivittatus* calculado en el programa Arlequin.

	<b>PP</b>	<b>BRB</b>	<b>CT</b>	<b>LLb</b>	<b>PCh</b>	<b>POch</b>	<b>IsLs</b>
<b>PP</b>	0.000						
<b>BRB</b>	23.535	0.000					
<b>CT</b>	12.282	9.569	0.000				
<b>LLb</b>	13.489	7.633	11.798	0.000			
<b>PCh</b>	3.041	2.562	2.963	4.120	0.000		
<b>POch</b>	2.883	2.391	2.879	4.286	13.237	0.000	
<b>IsLs</b>	2.165	1.858	2.096	3.165	4.286	4.402	0.000

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs). Todos los valores obtenidos son altamente significativos ( $P < 0.01$ ).

## ANEXOS

**Anexo 1.** Información tomada en el campo (edad, sexo y coordenadas geográficas) de los individuos utilizados en este estudio.

Puerto Baquerizo Moreno					Punta Pitt				
ID	E	S	16M	UTM	ID	E	S	16M	UTM
CT01	J	M	209487	9901446	PP01	A	M	249894	9921106
CT02	J	M	209489	9901440	PP02	J	F	249948	9921099
CT03	J	?	209486	9901452	PP03	A	F	249948	9921099
CT04	A	M	209496	9901457	PP04	A	M	249887	9921099
CT05	A	F	209451	9901472	PP05	J	M	249887	9921099
CT06	A	M	209485	9901446	PP06	A	M	249887	9921105
CT07	J	F	209518	9901471	PP07	A	F	249092	9921621
CT08	A	F	209487	9901439	PP08	A	M	249084	9921627
CT09	J	M	209457	9901475	PP09	J	M	249090	9921624
CT10	A	M	209432	9901480	PP10	A	F	249106	9921624
CT11	A	M	210024	9901655	PP31	ESCAPO		249094	9921627
CT12	A	F	210024	9901655	PP11	J	M?	247037	9922197
CT13	J	M	210024	9901655	PP12	A	F	247037	9922197
CT14	A	M	210008	9901753	PP13	A	M?	247037	9922197
CT15	A	M	209996	9901767	PP14	A	F	247037	9922197
LLb01	A	F	208927	9897856	PP15	J	M	247037	9922197
LLb02	SA	M	208933	9897856	PP16	A	M	247037	9922197
LLb03	A	M	208868	9897840	PP17	A	M	247037	9922197
LLb04	A	M	208868	9897840	PP18	A	F	247037	9922197
LLb05	A	M	208868	9897840	PP19	A	M	247037	9922197
LLb06	A	M	208868	9897840	PP20	A	M	247037	9922197
LLb07	A	F	208868	9897840	PP21	A	F	247037	9922197
LLb08	A	M	208927	9897856	PP22	A	F	247037	9922197
LLb09	J	F	208922	9897854	PP23	SA	M	247037	9922197
LLb10	A	F	208922	9897854	PP24	A	M	247037	9922197
LLb11	A	M	208931	9897868	PP25	A	F	247037	9922197
LLb12	A	M	208931	9897868	PP26	A	F	247037	9922197
LLb13	A	F	208933	9897856	PP27	J	F	247037	9922197
LLb14	SA	F	208927	9897856	PP28	A	M	247037	9922197
LLb15	A	F	208927	9897878	PP29	A	M	247037	9922197
					PP30	J	M	247037	9922197

## Continuación Anexo 1.....

<b>Bahía Rosa Blanca</b>					<b>Puerto Chino</b>				
<b>ID</b>	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>16M</b>	<b>UTM</b>	<b>ID</b>	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>16M</b>	<b>UTM</b>
BRB01	A	F	238075	9909531	PCh01	A	F	229560	9897420
BRB02	A	F	238075	9909531	PCh02	SA	M	229565	9897398
BRB03	A	F	238075	9909531	PCh03	A	F	229558	9897406
BRB04	SA	F	238075	9909531	PCh04	A	M	229558	9897406
BRB05	SA	M?	238075	9909531	PCh05	A	M	229556	9897418
BRB06	A	M	238075	9909531	PCh06	A	M	229554	9897422
BRB07	SA	M	238075	9909531	PCh07	A	M	229535	9897388
BRB08	A	F	238075	9909531	PCh08	A	F	229558	9897406
BRB09	J	M	238075	9909531	PCh09	A	F	229557	9897420
BRB10	A	M	238075	9909531	PCh10	A	M	229557	9897420
BRB11	A	F	238075	9909531	PCh11	A	M	229548	9897392
BRB12	A	M	238075	9909531	PCh12	SA	M	229549	9897386
BRB13	A	M	238075	9909531	PCh13	A	F	229557	9897420
BRB14	A	F	238075	9909531	PCh14	A	M	229528	9897338
BRB15	A	M	238075	9909531	PCh15	A	M	229548	9897392
BRB16	J	M	238075	9909531	PCh16	A	F	229529	9897392
BRB17	A	M	238075	9909531	PCh17	A	M	229529	9897392
BRB18	A	M	238075	9909531	PCh18	A	M	229532	9897400
BRB19	A	F	238075	9909531	PCh19	A	F	229556	9897370
BRB20	A	F	238075	9909531	PCh20	A	M	229556	9897370
BRB21	A	M	238075	9909531	PCh21	A	M	229571	9897404
BRB22	A	M	238075	9909531	PCh22	SA	M	229560	9897410
BRB23	A	F	238075	9909531	PCh23	SA	F	229571	9897404
BRB24	A	M	238075	9909531	PCh24	A	M	229560	9897406
BRB25	A	M	238075	9909531	PCh25	A	M	229544	9897406
BRB26	A	M	238075	9909531	PCh26	A	M	229529	9897392
BRB27	J	M	238075	9909531	PCh27	A	M	229576	9897320
BRB28	SA	F?	238075	9909531	PCh28	A	F	229527	9897318
BRB29	A	M	238075	9909531	PCh29	A	F	229579	9897410
BRB30	A	F	238075	9909531	PCh30	SA	M	229524	9897314



## Continuación anexo 1.....

Playa Ochoa					Islote Lobos				
ID	E	S	16M	UTM	ID	E	S	16M	UTM
PO01	J	F	213882	9904446	IsLs01	A	M	214231	9905324
PO02	A	M	213881	9904420	IsLs02	A	F	214235	9905354
PO03	A	F	213906	9904452	IsLs03	A	M	214229	9905340
PO04	A	F	213868	9904412	IsLs04	A	M	214238	9905306
PO05	A	F	213904	9904444	IsLs05	A	M	214237	9905308
PO06	A	F	213904	9904444	IsLs06	A	F	214435	9905318
PO07	A	M	213881	9904420	IsLs07	A	F	214414	9905318
PO08	A	F	213870	9904412	IsLs08	A	F	214435	9905318
PO09	A	F	213887	9904420	IsLs09	A	F	214372	9905314
PO10	A	F	213903	9904440	IsLs10	A	M	214387	9905304
PO11	A	F	213899	9904436	IsLs11	A	M	215372	9905310
PO12	A	F	213878	9904406	IsLs12	SA	F	214392	9905308
PO13	A	F	213897	9904452	IsLs13	SA	F	214436	9905310
PO14	A	M	213903	9904440	IsLs14	SA	F	214440	9905320
PO15	SA	F	213900	9904452	IsLs15	A	M	214562	9905340
PO16	A	M	213902	9904498	IsLs16	A	F	214524	9905324
PO17	J	M	213902	9904498	IsLs17	A	F	214574	9905332
PO18	A	M	213878	9904406	IsLs18	SA	F	214560	9905344
PO19	A/SA	F/M*	213821	9904394	IsLs19	A	M	214521	9905330
PO20	SA	M*	213821	9904394	IsLs20	A	F	214533	9905322
PO21	A	M	213922	9904444	IsLs21	A	F	214533	9905326
PO22	A	M	213776	9904372	IsLs22	A	F	214525	9905324
PO23	A	F	213786	9904380	IsLs23	A	F	214537	9905328
PO24	A	F?	213824	9904394	IsLs24	A	F	214534	9905330
PO25	A	F	213878	9904410	IsLs25	A	M	214570	9905322
PO26	A	M	213812	9904382	IsLs26	A	M	214570	9905322
PO27	A	F	213812	9904382	IsLs27	A	M	214521	9905322
PO28	A	F	213789	9904388	IsLs28	A	F	214557	9905348
PO29	A	F	213789	9904388	IsLs29	A	F	214503	9905320
PO30	A	F	213827	9904376	IsLs30	A	M	214557	9905348

E = Edad (A = adulto, SA = subadulto, J = juvenil), S = Sexo (F = hembra, M = macho), 16M = Longitud,  
UTM = Latitud

**Anexo 2.** Protocolo propuesto por el fabricante para cola de ratón – Technical Manual (p. 12).

1. Cada muestra fue macerada con nitrógeno líquido, en un tubo correctamente rotulado de 1,5 ml con ayuda de un micro pistilo, tanto los tubos como los micro pistilos fueron previamente enfriados.  
Al paralelo en un frasco de vidrio de 250 ml se añadió 22,2 ml de una solución de EDTA 0,5 M (pH 8,0) con 92.5 ml de solución de lisis y se enfriaron en hielo hasta que la solución se volvió de transparente a nublada. Se colocó 620µl de esta solución en cada tubo, y con ayuda del pistilo pequeño se homogeneizó cada muestra.
2. Se añadió 17.5µl de 20mg/ml proteinasa K y se incubó toda la noche a 55 ° C con agitación suave.
3. Se añadió 3µl de la RNasa A en cada tubo y se mezclaron las muestras invirtiendo los tubos 2-5 veces. Se incubó la mezcla durante 15-30 minutos a 37°C con agitación suave. Se retiraron las muestras del baño maría y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de continuar.
4. Se colocaron 200 µl de la solución de precipitación de proteínas y con ayuda de un vórtex se mezclaron vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos. Los tubos fueron colocados en hielo durante 5 minutos.
5. Se sacaron los tubos y se centrifugaron durante 4 minutos a 14000 rpm. La proteína se precipitó y formó un pellet de color blanco. Se retiró con cuidado el sobrenadante sin topar el pellet y se transfirió a un tubo de 1,5 ml (previamente rotulado) con 600µl de isopropanol a temperatura ambiente. Al invertir varias veces se pudo observar la formación de unas hebras blancas que darán origen al pellet.
6. Se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente. Se formó un pellet en la base del tubo, con cuidado se retiró el sobrenadante.
7. Se agregó en cada tubo 600µl de etanol al 75% a temperatura ambiente, se invirtieron suavemente los tubos varias veces para lavar el ADN. Para evitar que el pellet se desprenda se centrifugó por un minuto a 14000 rpm.
8. Se retiró cuidadosamente el etanol y se colocó el tubo de forma invertida en un papel absorbente limpio, y se esperó que el pellet se secase.
9. Para la resuspensión del pellet se agregó 100 µl de la Solución de Rehidratación de ADN, y se incubó en baño maría a 65°C durante 1 hora., con agitación suave.

**Anexo 3.** Microsatélites diseñados para las especies del género *Microlophus* (Jordan et al. 2002).

<b>Locus</b>	<b>N. Acc. GenBank</b>	<b>Motivo de repetición</b>	<b>Secuencia del primer 5'-3'</b>
Mic1	AF463628	(AC) <sub>13</sub>	F: TGCTAAGCATGAGCTACACC R: CCAACTAGCTGGCAC
Mic2	AF463629	(TAGA) <sub>2</sub> TAGC(TAGA) TGA(TA) <sub>2</sub> (TAGA) <sub>8</sub>	F: CAGTGGAACACACAGTATCC R: ACCTTAGGAATGACAGAAGG
Mic3	AF463630	(TAGA) <sub>8</sub>	F: GTGAGAACTGAACTGAAAGC R: TTTGTCTACAAACAAAACACTGC
Mic4	AF463631	(GATA) <sub>6</sub>	F: TGTTCATTTTCATCATCAAGC R: CTTCAACAAACATTGCAACC
Mic5	AF463632	(CA) <sub>14</sub>	F: AGGAACATTCTGCACTAAGG R: TTCCACTCTGCTCTACATCC
Mic6	AF463633	(AC) <sub>4</sub> TC(AC) <sub>3</sub> TC(AC) <sub>3</sub>	F: ATTCTCCCATAAAAATCTGC R: CAAGGAGCTCTTAGAAAAACC
Mic7	AF463634	(CA) <sub>5</sub> TA (CA) <sub>14</sub>	F: TTTATACACTATTTACAACCAAAGG R: TTCTTGATCTTCCCAGTAGG
Mic8	AF463635	(CA) <sub>3</sub> TA(CA) <sub>2</sub> AACACG (CA) <sub>8</sub>	F: TTCATGTAACCCTAATGATCC R: TGCTTTCCTCACACATGC
Mic9	AF463636	(CA) <sub>13</sub>	F: ATTCTTGTGCTGCTTACAGC R: TGTCTAGCAGAGGTCTCAT
Mic10	AF463637	(CA) <sub>9</sub>	F: ATAGTGGGATTTTCTCATGG R: CTTGATGGAGCTTTATTTCC
Mic11	AF463638	(CA) <sub>17</sub>	F: TGTGTTGATGGGGATACAG R: GCTTTTCCCAGAAGAACC
Mic12	AF463639	(CA) <sub>11</sub>	F: AGTACAATCGTTTAACTCTCTCC R: CCTCAGTTTCTGTACGATGG

**Anexo 4.** Valores obtenidos de concentración y pureza de las muestras de ADN de *Microlophus bivittatus*.

POP	ID	CANTIDAD ng/ul	CALIDAD 260/280	POP	ID	CANTIDAD ng/ul	CALIDAD 260/280
<b>PUERTO BAQUERIZO MORENO</b>	CT1	21.35	1.32	<b>PUNTA PTT</b>	PP1	14.86	1.21
	CT2	9.04	1.33		PP2	49.3	1.37
	CT3	14.08	1.28		PP3	31.46	1.37
	CT4	20.93	1.23		PP4	28.63	1.6
	CT5	21.2	1.83		PP5	8.89	1.56
	CT6	8.03	1.4		PP6	32.38	2.04
	CT7	10.26	1.71		PP7	29.81	1.6
	CT8	60.92	1.94		PP8	10.88	1.45
	CT9	7.17	1.61		PP9	4.86	1.11
	CT10	10.89	1.83		PP10	4.12	1.18
	CT11	4.42	1.25		PP11	9.71	1.35
	CT12	28.72	1.78		PP12	10.32	1.61
	CT13	6.41	0.91		PP13	22.62	1.86
	CT14	6.08	1.61		PP14	115.25	1.74
	CT15	2.38	1.54		PP15	119.29	1.1
	LLb01	67.45	1.71		PP16	3.79	1.4
	LLb02	55.42	1.55		PP17	145.7	1.16
	LLb03	93.09	1.65		PP18	145.92	1.75
	LLb04	91.1	1.62		PP19	44.27	1.66
	LLb05	66.55	1.67		PP20	17.05	1.68
	LLb06	66.23	1.83		PP21	10.41	1.62
	LLb07	112.97	1.75		PP22	138.13	1.87
	LLb08	109.25	1.53		PP23	108.45	1.72
	LLb09	53.03	1.7		PP24	23.23	1.79
	LLb10	155.05	1.93		PP25	65.41	1.76
	LLb11	130.24	1.65		PP26	153.38	1.82
	LLb12	113.12	1.68		PP27	45.94	1.51
	LLb13	51.41	1.56		PP28	7.31	1.24
	LLb14	41.33	1.77		PP29	264.38	1.82
	LLb15	32.09	1.67		PP30	96.23	1.66
				PP??	52.69	1.3	

Continuación Anexo 4.....

POP	ID	CANTIDAD ng/ul	CALIDAD 260/280	POP	ID	CANTIDAD ng/ul	CALIDAD 260/280
<b>BAHÍA ROSA BLANCA</b>	BRB01	74.15	1.75	<b>PUERTO CHINO</b>	PCh01	62.47	1.55
	BRB02	49.57	1.78		PCh02	50.37	1.4
	BRB03	24.44	1.52		PCh03	64.96	1.59
	BRB04	39.77	1.65		PCh04	42.8	1.6
	BRB05	35.67	1.8		PCh05	117.34	1.72
	BRB06	33.13	1.63		PCh06	220.54	1.49
	BRB07	56.01	1.41		PCh07	293.63	1.5
	BRB08	36.09	1.64		PCh08	110.84	1.34
	BRB09	12.54	1.69		PCh09	143.59	1.68
	BRB10	49.47	1.88		PCh10	96.11	1.53
	BRB11	73.21	1.71		PCh11	143.92	1.65
	BRB12	53.42	1.58		PCh12	189.24	1.41
	BRB13	86.64	1.76		PCh13	141.63	1.57
	BRB14	33.77	1.61		PCh14	232.02	1.43
	BRB15	25.33	1.4		PCh15	136.92	1.58
	BRB16	54.42	1.85		PCh16	113.56	1.63
	BRB17	76.41	1.74		PCh17	100.48	1.64
	BRB18	89.72	1.86		PCh18	197.11	1.61
	BRB19	43.83	1.84		PCh19	98.75	1.48
	BRB20	53.19	1.64		PCh20	145.24	1.41
	BRB21	180.24	1.96		PCh21	228.96	1.53
	BRB22	155.45	1.34		PCh22	106.11	1.67
	BRB23	5.26	1.04		PCh23	170.82	1.38
	BRB24	31.12	1.88		PCh24	63.48	1.5
	BRB25	9.38	1.68		PCh25	92.26	1.42
	BRB26	86.85	1.84		PCh26	58.02	1.44
	BRB27	30.47	1.65		PCh27	150.2	1.37
	BRB28	54.9	1.92		PCh28	61.81	1.83
	BRB29	81.16	1.62		PCh29	277.57	1.75
	BRB30	47.02	1.82		PCh30	242.02	1.36

Continuación Anexo 4....

POP	ID	CANTIDAD ng/ul	CALIDAD 260/280	POP	ID	CANTIDAD ng/ul	CALIDAD 260/280
<b>PLAYA OCHOA</b>	POch01	56.89	1.85	<b>ISLOTE LOBOS</b>	IsLs01	77.02	1.9
	POch02	99.64	1.69		IsLs02	108.31	1.91
	POch03	79.23	1.71		IsLs03	68.41	1.92
	POch04	41.87	1.97		IsLs04	82.58	1.85
	POch05	64.55	1.71		IsLs05	116.37	1.82
	POch06	101.3	1.57		IsLs06	81.85	1.89
	POch07	95.49	1.48		IsLs07	73.96	1.89
	POch08	58.9	1.32		IsLs08	100.39	1.79
	POch09	69.37	1.54		IsLs09	128	1.64
	POch10	91.14	1.85		IsLs10	46.08	1.54
	POch11	104.27	1.87		IsLs11	134.14	1.84
	POch12	84.23	1.64		IsLs12	51.04	1.87
	POch13	72.82	1.68		IsLs13	106.1	1.78
	POch14	84.04	1.72		IsLs14	88.39	1.79
	POch15	89.92	1.75		IsLs15	172.51	1.49
	POch16	80.38	1.83		IsLs16	63.82	1.44
	POch17	37.21	1.66		IsLs17	58.14	1.69
	POch18	84.92	1.73		IsLs18	98.07	1.22
	POch19	103.41	1.6		IsLs19	87.89	1.74
	POch20	92.71	1.66		IsLs20	68.43	1.73
	POch21	62.46	1.47		IsLs21	56.53	1.73
	POch22	75.54	1.87		IsLs22	119.29	1.63
	POch23	48.88	1.87		IsLs23	189.99	1.69
	POch24	77.57	1.78		IsLs24	151.18	1.67
	POch25	74.36	1.79		IsLs25	157.01	1.59
	POch26	67.29	1.78		IsLs26	133.44	1.72
	POch27	79.09	1.89		IsLs27	239.87	1.48
	POch28	102.59	1.76		IsLs28	92.7	1.6
	POch29	76.2	1.9		IsLs29	128.58	1.55
	POch30	64.08	1.68		IsLs30	83.26	1.73



**Anexo 5.** Frecuencias alélicas de cada loci dentro de cada localidad analizadas, Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO) e Islote Lobos (IsLs).

**Anexo 6.** Pares de loci ligados en cada población, obtenidos con el programa GenePop.

Localidad	Locus 1	Locus 2	valor-P	S.E.
Punta Pitt (PP)	Mic01	Mic06	0.000***	0
	Mic01	Mic07	0.042*	0.016
	Mic01	Mic08	0.002**	0.002
	Mic02	Mic07	0.032*	0.016
	Mic04	Mic06	0.029*	0.008
	Mic04	Mic09	0.011*	0.005
	Mic05	Mic11	0.003**	0.002
	Mic05	Mic12	0.000***	0
	Mic06	Mic09	0.000***	0
	Mic07	Mic08	0.031*	0.012
	Mic11	Mic12	0.000***	0
Bahía Rosa Blanca (BRB)	Mic01	Mic06	0.000***	0
	Mic01	Mic07	0.007**	0.005
	Mic01	Mic08	0.034*	0.009
	Mic02	Mic03	0.000***	0
	Mic02	Mic11	0.001**	0.001
	Mic03	Mic11	0.003**	0.002
	Mic03	Mic12	0.022*	0.011
	Mic04	Mic07	0.003**	0.003
	Mic04	Mic10	0.000***	0
	Mic05	Mic11	0.000***	0
	Mic05	Mic12	0.000***	0
	Mic06	Mic09	0.000***	0
	Mic06	Mic11	0.031*	0.005
	Mic07	Mic10	0.029*	0.01
Mic11	Mic12	0.000***	0	
Puerto Baquerizo Moreno (PBM)	Mic01	Mic06	0.000***	0
	Mic01	Mic08	0.035*	0.014
	Mic02	Mic10	0.021*	0.011
	Mic05	Mic12	0.000***	0
	Mic06	Mic09	0.000***	0
	Mic07	Mic08	0.000***	0
	Mic07	Mic10	0.039*	0.014
	Mic08	Mic12	0.000***	0
	Mic11	Mic12	0.014*	0.005
Puerto Chino (PCh)	Mic01	Mic08	0.010*	0.007
	Mic04	Mic07	0.001**	0.001
	Mic06	Mic07	0.000***	0
	Mic11	Mic12	0.008**	0.003



## Continuación Anexo 6....

Playa Ochoa (PO)	Mic02	Mic03	0.000***	0
	Mic01	Mic06	0.000***	0
	Mic01	Mic08	0.000***	0
	Mic05	Mic08	0.008**	0.005
	Mic06	Mic09	0.047*	0.005
	Mic05	Mic11	0.000***	0
	Mic09	Mic11	0.005**	0.001
	Mic02	Mic12	0.019*	0.006
	Mic05	Mic12	0.007**	0.005
	Mic11	Mic12	0.014*	0.006
Islote Lobos (IsLs)	Mic02	Mic03	0.000***	0
	Mic04	Mic05	0.006**	0.002
	Mic04	Mic06	0.039*	0.009
	Mic06	Mic09	0.001***	6 <sup>E-04</sup>
	Mic01	Mic10	0.043*	0.009
	Mic04	Mic10	0.002**	0.001
	Mic02	Mic11	0.008**	0.002
	Mic05	Mic11	0.006**	0.002
	Mic09	Mic11	0.003**	7 <sup>E-04</sup>
	Mic05	Mic12	0.000***	0
	Mic11	Mic12	0.004**	0.001

**Anexo 7.** Valores de P obtenidos en el análisis de desequilibrio ligado en cada par de locus a través de todas las localidades (método Fisher), obtenidos con el programa GenePop.

<b>Par de locus</b>	<b>Chi<sup>2</sup></b>	<b>gl</b>	<b>Valor – P</b>
Mic01 & Mic02	0.828	10	1
Mic01 & Mic03	0.572	10	1
Mic01 & Mic04	1.304	10	0.999
Mic01 & Mic05	3.816	10	0.955
Mic01 & Mic06	Infinito	10	***
Mic01 & Mic07	24.2176	10	0.007**
Mic01 & Mic08	Infinito	10	***
Mic01 & Mic09	4.7993	10	0.904
Mic01 & Mic10	4.604	10	0.916
Mic01 & Mic11	5.828	10	0.83
Mic01 & Mic12	1.833	10	0.997
Mic02 & Mic03	Infinito	10	***
Mic02 & Mic04	6.0639	10	0.81
Mic02 & Mic05	9.8993	10	0.449
Mic02 & Mic06	7.3127	10	0.696
Mic02 & Mic07	8.8865	10	0.543
Mic02 & Mic08	10.2355	10	0.42
Mic02 & Mic09	11.5249	10	0.318
Mic02 & Mic10	16.5296	10	0.085
Mic02 & Mic11	22.5594	10	0.012
Mic02 & Mic12	15.1194	10	0.128
Mic03 & Mic04	2.6275	10	0.989
Mic03 & Mic05	8.6699	10	0.564
Mic03 & Mic06	12.2378	10	0.269
Mic03 & Mic07	12.3849	10	0.26
Mic03 & Mic08	8.0116	10	0.628
Mic03 & Mic09	14.1015	10	0.168
Mic03 & Mic10	13.6544	10	0.189
Mic03 & Mic11	25.6811	10	0.004**
Mic03 & Mic12	8.1332	10	0.616
Mic04 & Mic05	9.2662	10	0.507
Mic04 & Mic06	11.2532	10	0.338
Mic04 & Mic07	26.3069	10	0.003**
Mic04 & Mic08	0.7325	10	1
Mic04 & Mic09	10.8111	10	0.372
Mic04 & Mic10	Infinito	10	***
Mic04 & Mic11	9.8798	10	0.451

## Continuación Anexo 7....

<b>Par de locus</b>	<b>Chi<sup>2</sup></b>	<b>gl</b>	<b>Valor – P</b>
Mic04 & Mic12	11.157	10	0.345
Mic05 & Mic06	12.2888	10	0.266
Mic05 & Mic07	8.2829	10	0.601
Mic05 & Mic08	22.156	10	0.014**
Mic05 & Mic09	9.8634	10	0.453
Mic05 & Mic10	9.1752	10	0.516
Mic05 & Mic11	Infinito	10	***
Mic05 & Mic12	Infinito	10	***
Mic06 & Mic07	Infinito	10	***
Mic06 & Mic08	13.1246	10	0.217
Mic06 & Mic09	Infinito	10	***
Mic06 & Mic10	5.3361	10	0.868
Mic06 & Mic11	19.3695	10	0.036*
Mic06 & Mic12	5.286	10	0.871
Mic07 & Mic08	Infinito	10	***
Mic07 & Mic09	12.5721	10	0.249
Mic07 & Mic10	20.5812	10	0.024*
Mic07 & Mic11	2.7217	10	0.987
Mic07 & Mic12	5.054	10	0.888
Mic08 & Mic09	12.0413	10	0.282
Mic08 & Mic10	2.4832	10	0.991
Mic08 & Mic11	6.3199	10	0.788
Mic08 & Mic12	Infinito	10	***
Mic09 & Mic10	10.0726	10	0.434
Mic09 & Mic11	21.8961	10	0.016**
Mic09 & Mic12	10.0924	10	0.432
Mic10 & Mic11	6.4768	10	0.774
Mic10 & Mic12	9.5372	10	0.482
Mic11 & Mic12	Infinito	10	***

**Anexo 8.** Análisis global (test de Fisher) del equilibrio Hardy-Weinberg por localidades, obtenidos con el programa GenePop.

Localidad	Chi <sup>2</sup>	grados de libertad	Probabilidad	Significancia
PP	infinito	24	nrp	***
BRB	infinito	24	nrp	***
PBM	infinito	24	nrp	***
PCh	infinito	24	nrp	***
PO	infinito	24	nrp	***
IsLs	infinito	24	nrp	***
<b>TOTAL</b>	infinito	92	nrp	***

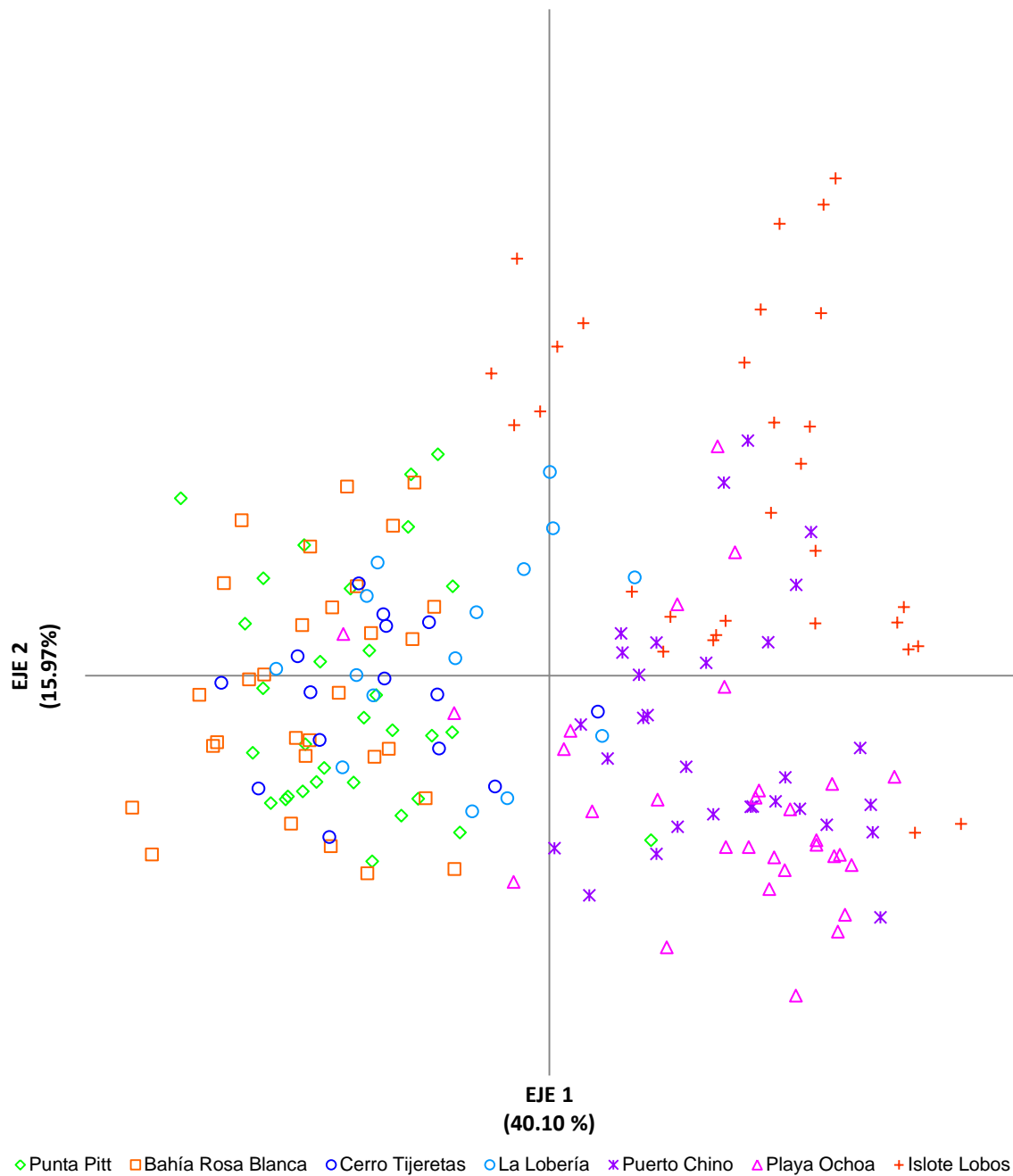
nrp = no reportado por el programa

Punta Pitt (PP), Bahía Rosa Blanca (BRB), Puerto Baquerizo Moreno (PBM), Puerto Chino (PCh), Playa Ochoa (PO), Islote Lobos (IsLs)

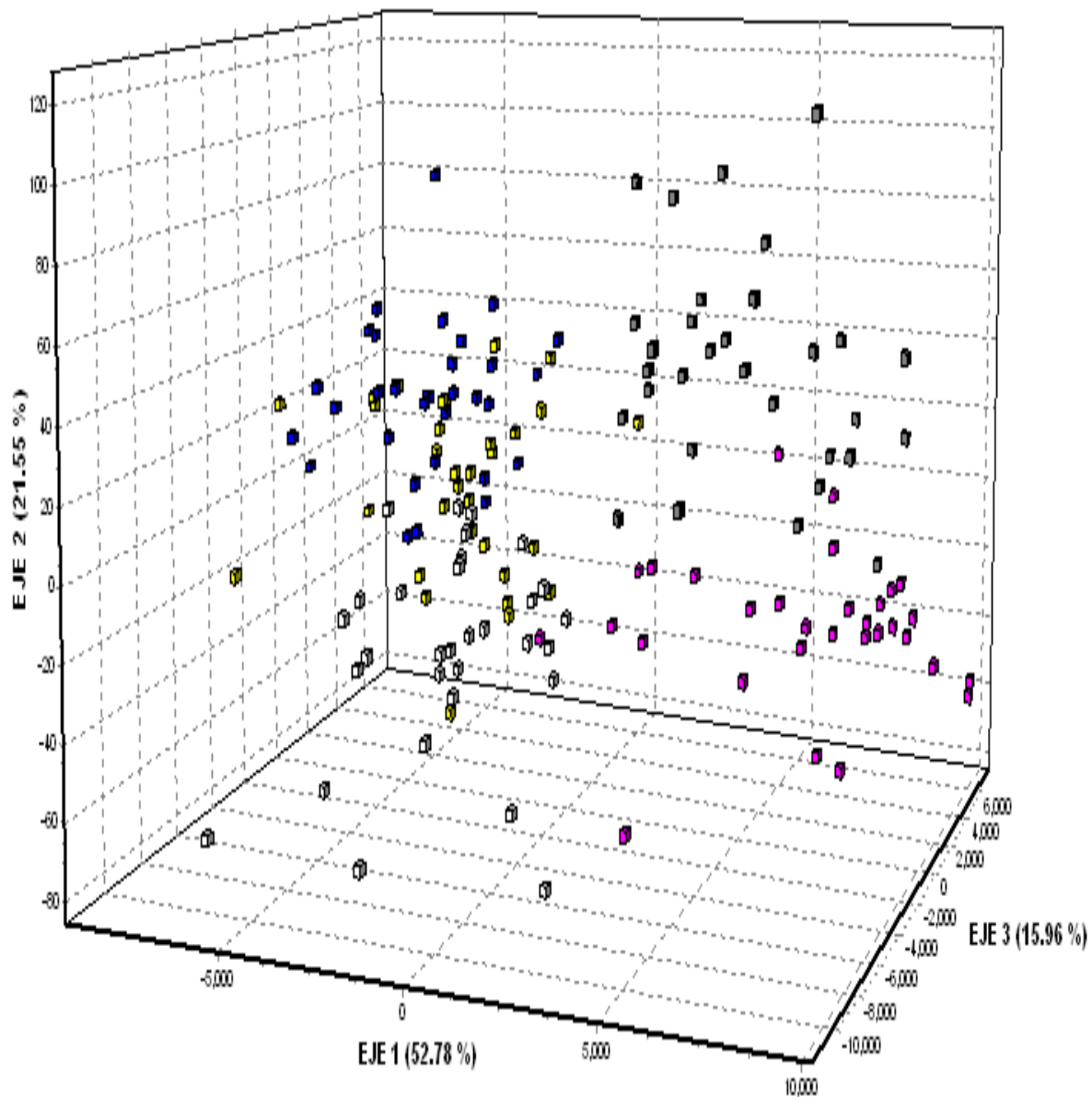
**Anexo 9.** Análisis global (test de Fisher) del equilibrio Hardy-Weinberg por locus, obtenidos con el programa GenePop.

Locus	Chi <sup>2</sup>	grados de libertad	Probabilidad	Significancia
Mic01	infinito	10	nrp	***
Mic02	infinito	10	nrp	***
Mic03	20.048	10	0.0288	*
Mic04	infinito	10	nrp	***
Mic05	infinito	10	nrp	***
Mic06	40.2617	10	0.0000	***
Mic07	infinito	10	nrp	***
Mic08	51.8116	10	0.0000	***
Mic09	infinito	10	nrp	***
Mic10	infinito	10	nrp	***
Mic11	32.6228	10	0.0003	***
Mic12	28.7762	10	0.0014	***

nrp = no reportado por el programa



**Anexo 10.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando la distancia “simple matching”.



**Anexo 11.** Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) en tres dimensiones realizado en los individuos de las cinco localidades.