

Baixa capacitat de dispersió i elevada especialització ecològica causen una profunda estructura genètica a petita escala espacial: el cas del cargol de terra endèmic i amenaçat *Xerocrassa montserratensis*

Cristina Català¹, Vicenç Bros², Xavier Castellort³, Xavier Santos⁴, Marta Pascual^{1,*}

¹ Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística / IRBio, Universitat de Barcelona, Avgda. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

² Oficina Tècnica de Parcs Naturals, Diputació de Barcelona, c/Urgell 187, Edif. Relotge 3^a, E-08036 Barcelona, Catalonia, Spain

³ Departament de medi ambient i ciències del sòl, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198. Lleida Catalonia, Spain

⁴ CIBIO/InBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, R. Padre Armando Quintas s/n, 4485-661 Vairão, Portugal

* Autor per la correspondència: Marta Pascual. Correu-e: mpascual@ub.edu

RESUM: Les espècies amb petits rangs geogràfics no tenen una estructura genètica alta. No obstant això, alguns cargols de terra amb baixa capacitat de dispersió i una alta especialització ecològica en l'hàbitat ocupat poden patir una reducció del flux genètic entre poblacions i mostrar molta estructura genètica degut a fragmentació històrica i aïllament. Hem investigat la filogeografia de *Xerocrassa montserratensis*, un cargol de terra endèmic de Catalunya i amb una distribució molt reduïda i fragmentada. Aquest cargol només viu en les vessants rocoses xeròfiles de massissos formats per

conglomerats. En aquest estudi hem fet la hipòtesi que l'espècie presentarà una alta diferenciació genètica entre poblacions causada per una fragmentació del seu hàbitat preferit i una baixa capacitat de dispersió. Hem seqüenciat el gen mitocondrial Citocrom Oxidasa I (COI) de 152 individus de vuit poblacions que cobreixen tot el seu rang de distribució per descobrir la relació genètica de les seves poblacions. L'arbre d'haplotips va identificar quatre grups genètics parcialment coincidents amb la seva distribució geogràfica. El grup central conté haplotips compartits entre cinc poblacions (poblacions de Sant Llorenç i zones properes) i sembla que és el més ancestral, mentre que els tres grups restants estan restringits a una sola localitat. Dos d'aquests grups (Montserrat i Els Munts) estan aïllats geogràficament i genèticament, i indiquen que la seva diferenciació pot correspondre a una expansió de llarg abast i a un aïllament posterior. El tercer grup (Montcau), no obstant això, no està aïllat geogràficament del grup central, tot i que està altament diferenciat genèticament, probablement a causa d'una fragmentació històrica i un contacte secundari posterior. La datació de l'arbre amb els principals grups d'haplotips confirma que la fragmentació de l'espècie es podria haver produït durant les glaciacions pleistocèniques. Fenòmens geomorfològics locals haurien mantingut aïllades algunes poblacions (p.e. Els Munts, Montcau i Sant Jeroni). A més, els cargols d'una de les poblacions més aïllades (Marina) comparteixen haplotips amb el grup central, suggerint una gran dispersió passiva a través de torrents i rius. El nostre estudi revela que alguns organismes de petita distribució geogràfica i baixa capacitat de dispersió, poden mostrar escenaris filogeogràfics complexos que poden explicar-se mitjançant la existència de barreres geomorfològiques, combinat amb capacitat de dispersió passiva a llargues distàncies.

1. Introducció

La conca mediterrània es considera un dels punts d'elevada biodiversitat a causa de les elevades taxes d'endemicitat i riquesa d'espècies (Medail i Quezel, 1999; Myers et al., 2000; Cuttelod, et al., 2008). No obstant això, el coneixement sobre la seva biodiversitat es molt elevat en plantes, animals vertebrats i alguns grups d'artròpodes, mentre que altres grups d'animals invertebrats com els cargols terrestres són, en la seva majoria, desconeguts (Lydeard et al., 2004). Malgrat els pocs estudis adreçats als cargols terrestres mediterranis, aquest grup està format per al voltant de 1690 espècies amb un alt índex d'endemicitat i diversificació evolutiva (Welter-Schultes, 2012). Els cargols terrestres són organismes amb molt baixa capacitat de dispersió (Baur, 1986; Baur, 1993; Armbruster, et al., 2007). Algunes espècies tenen amplis rangs de distribució (Schweiger, 2004) sovint associats a requeriments ecològics generalistes (Guiller i Madec, 2010; Guiller et al., 2012). No obstant això, moltes espècies tenen petits rangs de distribució i una especialització ecològica considerable (Dahirel et al., 2014; Moreira et al., 2015). Alguns trets de la seva història natural com la baixa mobilitat i l'especialització ecològica, fan que els cargols terrestres siguin bons candidats per a presentar una elevada estructura genètica (Davison, 2002). De fet, els cargols terrestres són organismes adequats per examinar les relacions filogeogràfiques entre poblacions. Aquest enfocament pot proporcionar informació sobre la diversitat genètica intraespecífica i els processos demogràfics històrics com l'aïllament, el flux genètic i l'expansió / contracció del rang de distribució de les espècies (Pfenninger i Posada, 2002; Haase et al., 2003; Kokshoorn i Gittenberger, 2012; Harl, et al. , 2014; Madeira et al., 2017). En definitiva, els estudis filogeogràfics poden ajudar a delimitar mesures de conservació d'espècies com els cargols terrestres del Mediterrani, per a les quals es desconeixen les característiques ecològiques bàsiques.

La genètica de la conservació és un camp del coneixement que reforça la biologia de la conservació. Els coneixements derivats de les anàlisis genètiques contribueixen no només a preservar la diversitat d'espècies i d'ecosistemes, sinó també a mantenir la diversitat genètica mateixa mitjançant la identificació de poblacions genèticament diferenciades de la mateixa espècie, nomenant-les unitats significativament evolutives o unitats de gestió (Holland, i Hadfield, 2002; Gomez-Moliner et al., 2009). Els coneixements derivats dels estudis filogeogràfics també ajuden a estudiar i definir els plans de conservació d'espècies endèmiques amenaçades, com ara alguns cargols terrestres (Holanda, i Hadfield, 2002; Sauer i Hausdorf, 2010; Sauer et al., 2013). Els estudis filogeogràfics també han estat molt útils per donar suport a la biologia de la conservació, ja que contribueixen a augmentar el coneixement d'espècies amenaçades i, per tant, ajuden a establir prioritats de recuperació d'espècies, per exemple, avaluant el nombre efectiu d'individus o les relacions genètiques entre elles (Haig, 1998).

Els cargols terrestres del gènere *Xerocrassa* es distribueixen a tota la conca mediterrània (Ezzine et al., 2017). Inclouen unes 50 espècies descrites a Europa i moltes subespècies (Bank & Neubert, 2017). Algunes espècies són morfològicament críptiques i només els estudis moleculars descobreixen una delimitació específica (Sauer i Hausdorf, 2012). Alguns arxipèlags mediterranis com ara Grècia i les Illes Balears, concentren la major part de les espècies, en la seva majoria espècies endèmiques d'aquests arxipèlags (17 espècies a Grècia i 11 a les Illes Balears) la qual cosa suggereix el potencial de diferenciació genètica d'aquest grup a causa de l'especialització ecològica i la baixa capacitat de dispersió (Chueca et al., 2017; Hausdorf & Sauer, 2009).

El nostre estudi se centra en el cargol terrestre *Xerocrassa montserratensis*, una espècie endèmica procedent del nord-est de la Península Ibèrica. La seva distribució geogràfica és molt petita, amb una superfície d'ocupació de 448 km² (Martínez-Ortí, 2011) fragmentada en diverses zones aïllades entre elles (Martínez-Ortí i Bros, 2017). A més, aquest cargol mostra una alta especialització de l'hàbitat, ja que viu gairebé exclusivament en codines, espais oberts de pendents pedregosos fets de conglomerat (Bros, 2011; Santos et al., 2012). A finals del segle XIX es van descriure tres subespècies basades en trets morfològics de la closca: *X. m. montserrantesis*, *X. m. betulonensis* i *X. m. delicatula* (Arnet i Bofill, 1879; Bofill, 1898). Aquesta taxonomia no ha estat validada amb dades moleculars.

El nostre estudi té com a objectiu examinar l'estructura genètica de *X. montserratensis* en tot el rang de distribució i entendre com els processos geomorfològics poden actuar per estructurar la seva història evolutiva. Concretament, es pretenia abordar els següents objectius: 1) avaluar la diversitat genètica de l'espècie; 2) analitzar la diferenciació entre les poblacions; i 3) provar si l'estructura genètica de la població s'explica per l'expansió, l'aïllament per distància o les barreres per al flux de gens. A més, volíem també: 4) confirmar la validesa de les tres subespècies actualment reconegudes, i 5) confirmar la hipòtesi de Bofill (1898) de dispersió passiva degut als aiguats d'una població aïllada.

Les espècies de cargols amb rangs geogràfics reduïts generalment no mostren estructura genètica (Baur, 1993; Greve, et al. 2017). No obstant això, hi ha casos particulars en què les espècies de petita mida poden mostrar estructura genètica, e. g., espècies amb alta especialització d'hàbitat que viuen en paisatges fragmentats i / o espècies amb baixa capacitat de dispersió. S'espera que la combinació d'aquests factors redueixi el flux genètic entre les poblacions i, consegüentment, produeixi una estructura

genètica alta (Ursenbacher et al., 2010; Sauer et al., 2013; Fehér et al., 2013; Madeira et al., 2017). Tenint en compte la distribució fragmentada, la limitada capacitat de dispersió i l'alta especialització de l'hàbitat (Santos et al., 2012), les estructures naturals, com els rius i els hàbitats inadequats, p.e. les masses forestals molt denses, poden actuar com a barreres geogràfiques per a *X. montserratensis*. En conseqüència, esperem una alta estructura genètica lligada als processos geomorfològics a petita escala geogràfica

2. Materials i mètodes

2.1. Àmbit de distribució, requisits ecològics i taxonomia

Xerocrassa (Amandana) montserratensis (Hidalgo, 1870) és un cargol de terra de menys d'1 cm de longitud de closca (Figura 1). Ocupa una extensió geogràfica de 3.600 km² i una superfície d'ocupació de només 448 km² (Martínez-Ortí, 2011). La distribució fragmentada és causada per la seva especialització en l'hàbitat preferit ja que només habita les codines (Figura 1), vessants pedregosos d'ambients xeròfils de muntanya on domina el conglomerat amb sòl prim i poca vegetació arbustiva i herbàcia (Bros, 2011). Després de la dissolució de la matriu calcària de conglomerats, les pedres que queden lliures es converteixen en microhàbitats adequats per a *X. montserratensis*. Les codines es distribueixen de manera dispersa en punts aïllats envoltats de bosc i matoll dens (Figura 2).

Figura 1: Distribució actual i històrica de *Xerocrassa montserratensis*. En gris es mostren les localitats històriques en què ha estat citada l'espècie segons Martínez-Ortí & Bros (2017), i en vermell les tres localitats tipus descrites.

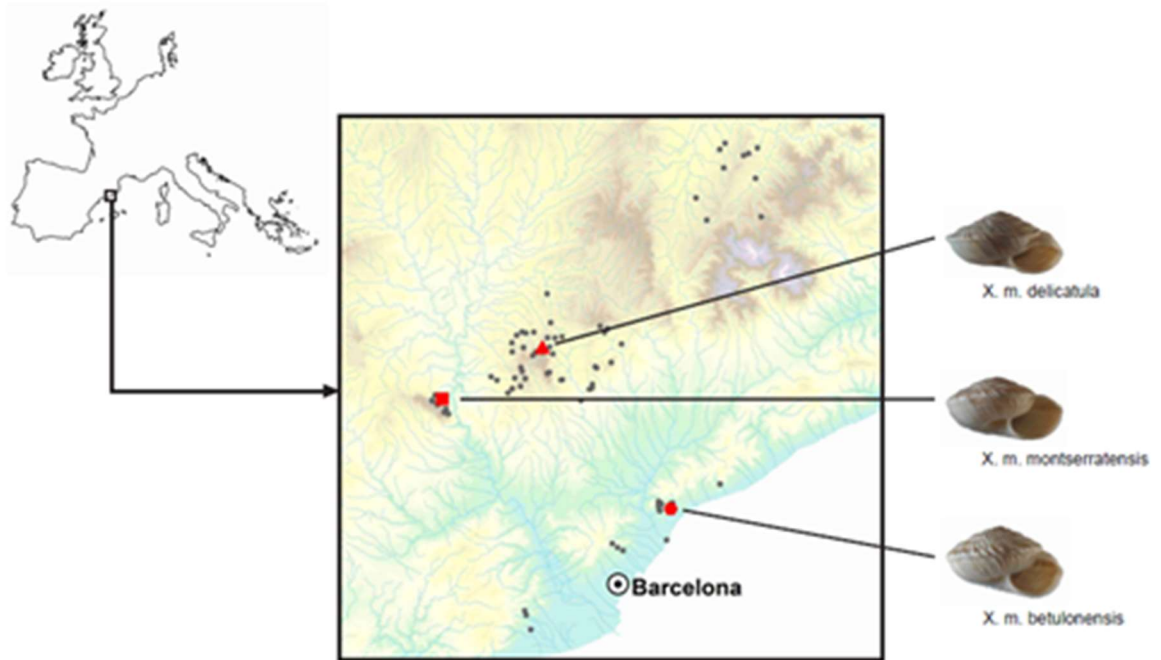
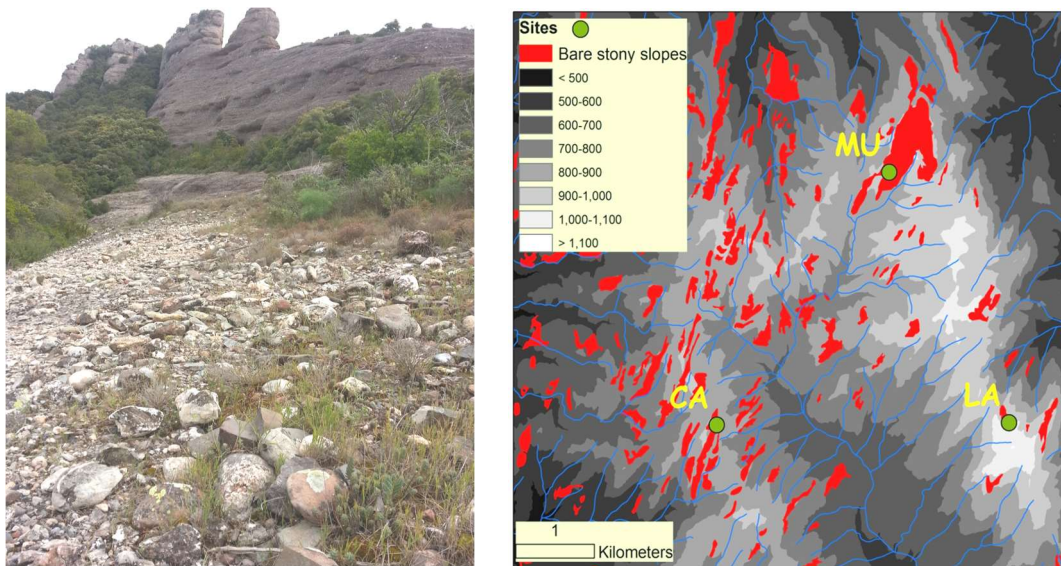


Figura 2: Imatge que mostra les codines, hàbitat adequat per a *X. montserratensis* (esquerra) i mapa de la part central del Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac on es mostren en vermell la distribució de codines (dreta), i la localització de les tres localitats del parc on es van recollir mostres: Montcau (MU), Castellsapera (CA) i La Mola (LA).



El cargol terrestre *X. montserratensis* està catalogat En perill d'extinció a la llista vermella d'espècies amenaçades (Martínez-Ortí, 2011) per diversos motius: 1) un rang de distribució petit i fragmentat ja que els talussos pedregosos habitats per l'espècie estan envoltats de boscos densos i inadequats (Santos et al., 2012). 2) La baixa capacitat de dispersió dificulta la migració de cargols entre subpoblacions i la recolonització de codines on les poblacions s'havien extingit. 3) L'erosió de l'hàbitat mitjançant activitats de senderisme (Bros, 2011; Bros, 2013). 4) La pèrdua d'hàbitats adequats per reforestació natural (Parcerisas, et al., 2012; Basnou et al., 2013; Otero et al., 2015) a causa de l'expansió del bosc d'alzina i pi (Carnicer et al., 2013) en detriment de hàbitats oberts on molts cargols terrestres xeròfils tenen els seus hàbitats preferits (Torre et al. 2014). Per contra, el foc forestal afavoreix la dispersió de les poblacions ja que l'obertura dels paisatges després d'un incendi millora la qualitat de l'hàbitat (Santos et al., 2009; Santos et al., 2012).

Malgrat el seu reduït rang de distribució, a finals del segle XIX es van descriure tres subespècies basades en trets morfològics de la closca: *X. m. montserrantensis*, *X. m. betulonensis* i *X. m. delicatula* (Arnet i Bofill, 1879; Bofill, 1898; Figura 2). La distribució de dues d'aquestes subespècies es va limitar a unes poques localitats: *X. m. delicatula* només es va descriure a la zona del Montcau en el Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac (Bofill, 1898), *X. m. betulonensis* només es va trobar a tres localitats: Gallifa i Sentmenat (Serralada Prelitoral) i Marina (Serralada Litoral), i *X. m. montserrantensis* en la resta de la distribució (Figura 2). Bofill (1898) va plantejar la hipòtesi que la població de Marina (l'única població situada en litologia no conglomerat) podria derivar de poblacions situades a la Serralada Prelitoral per dispersió passiva de torrents i rius durant les pluges i les inundacions; tanmateix, aquesta hipòtesi encara no ha estat confirmada. Diversos estudis han suggerit que les

subespècies *X. m. montserrantesis* i *X. m. betulonensis* eren espècies diferents (Altimira, 1971; Puente, 1994; Martínez-Ortí i Uribe, 2008). No obstant això, un estudi recent que analitzava els caràcters de la closca i els trets anatòmics dels òrgans reproductius no identificava les diferències morfològiques en els trets històricament utilitzats per a discriminar les tres subespècies en individus de les diferents àrees (Martínez-Ortí i Bros, 2017)

2.2. *Mostreig de cargols*

Es van recollir cargols de vuit poblacions que cobrien tot el rang conegut de l'espècie (Figura 2; i Taula S1). Totes les localitats de mostreig es trobaven en la Serralada Prelitoral Catalana, a excepció de Marina situada a la Serralada Litoral Catalana (Figura 2). La majoria dels llocs de mostreig corresponen a parcs naturals gestionats per diferents institucions (Taula S1). La litologia de totes aquestes localitats està composta codines de conglomerats (Figura 1) amb l'única excepció de La Marina, caracteritzada per ser la localitat de més baixa altitud amb litologies de granodiorites del Paleozoic (Taula S1).

Un total de 152 cargols de mida juvenil es van recollir entre la tardor de 2013 i la tardor de 2014, tret de La Mola recollida l'hivern de 2015. El permís per recollir els exemplars va ser concedit per les autoritats corresponents dels parcs naturals gestionats per la Diputació de Barcelona, Patronat de la Muntanya de Montserrat i del Servei de Fauna i Flora de la Generalitat de Catalunya. Es van agafar aproximadament 20 cargols per localitat i es van conservar en etanol absolut per realitzar posteriors anàlisis genètiques.

2.3 Extracció, amplificació, seqüenciació i alineació de l'ADN

Per a cada cargol, un fragment d'1 mm de mida del múscul es va assecat a l'aire i l'ADN genòmic total es va extreure amb el kit mini QIAamp® DNA (QUIAGEN), i posteriorment es va introduir en 50 µl de tampó AE. Els encebadors universals LCO1490 / HCO2198 (Folmer et al., 1994) es van utilitzar per amplificar un fragment d'uns 660 pb del gen citocromo-oxidasa I (COI) situat en el ADN mitocondrial. Les amplificacions de PCR es van dur a terme en un volum total de 20 µl incloent: 2µl de 5 × Buffer (GoTaq, Promega), 1 µl de 25nmol MgCl₂, 0,5 µl de dNTP (1 mM), 0,4 µl de cada imprimació (10 µM), 0,2 µl de Taq polimerasa corresponent a una unitat (GoTaq, Promega) i 1µl d'ADN. La PCR va començar amb una desnaturalització inicial a 94°C durant 5 minuts, seguida de 35 cicles d'una etapa de desnaturalització a 94°C durant 1 min, un pas d'anellament a 50°C durant 1 min, un pas d'elongació a 72°C durant 1min 30s, i un pas d'elongació final a 72°C durant 7 min. El DNA amplificat es va purificar amb Exo-SAP (exonucleasa de 0,2 U / µl i 0,2 U / µl de fosfatasa de gambeta) a una proporció de 1:2 (producte ExoSap: PCR) i la cadena cap a endavant va ser seqüenciada per MacroGen Inc dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Els cromatogrames de seqüència es van comprovar visualment, es van alinear i es van tallar amb SeqMan II (DNASTAR, Madison, WI). Totes les seqüències es van combinar amb BioEdit (versió 7.0.8.0) (Hall, 1999). Abans de les anàlisis, les seqüències de COI es van traduir en aminoàcids amb la versió 5 de MEGA (Tamura et al., 2011) i es va comprovar que no mostraven codons de parada.

2.4 Anàlisi de dades

La diversitat d'haplotips, la diversitat de nucleòtids i les seves desviacions estàndard es van calcular per a cada població amb DnaSP 5.10 (Librado i Rozas, 2009). Per tal de

comparar aquests valors, les estadístiques i els intervals de confiança asimptòtics derivats de Salicru et al. (1993) es van utilitzar tant per a la comparació de la diversitat global com per a comparacions entre parelles de poblacions. Les freqüències d'haplotips es van calcular utilitzant Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier et al., 2005). Contrib (Petit et al., 1998) es va utilitzar per calcular la riquesa al·lèlica i per comparar el nombre d'haplotips entre localitats que tenen un nombre diferent d'individus analitzats. La prova de neutralitat D de Tajima (Tajima, 1989) i la prova d'expansió demogràfica R2 (Ramos-Onsins i Rozas, 2002) es van obtenir amb DnaSP 5.10.

La comparació en la diversitat genètica dintre i entre poblacions es va calcular amb un anàlisi de la variància molecular (AMOVA) utilitzant Arlequin; les estadístiques F_{st} i la seva importància per parella amb es van obtenir amb el mateix programari. La taxa de descobriment fals (FDR) es va aplicar mitjançant la correcció Benjamini-Yekutieli (Narum, 2006) per tenir en compte múltiples comparacions. Es va realitzar una Anàlisi de Coordenades Principals (PCoA) amb GenAlEx (Peakall, & Smouse, 2012) per identificar les relacions genètiques entre les poblacions en un mapa bidimensional mitjançant mesures de distàncies F_{st} entre parells de poblacions.

Es va crear una xarxa d'haplotips utilitzant l'algorisme de xarxa d'unió mitjana amb la xarxa de programari (Bandelt et al., 1999). Aquest programari es va utilitzar per reconstruir filogènies intraespecífiques i així mostrar el nombre de canvis de nucleòtids entre haplotips semblants. Les relacions filogenètiques entre haplotips es van estimar utilitzant els mètodes de probabilitat màxima (ML) i Bayesian Inference (BI). Es va utilitzar *Xerocrassa cretica* com a grup extern, i les seqüències d'aquesta espècie es van obtenir de Genbank (números FJ627168.1 i FJ627150.1; Sauer & Hausdorf, 2009). Aquesta espècie va ser seleccionada després de la investigació amb

totes les espècies del gènere *Xerocrassa* disponibles a Genebank per al mateix marcador (dades no mostrades).

El millor model evolutiu va ser GTR + I + G identificat per jModelTest (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012). Es va realitzar una prova de saturació de substitució tal com es va implementar a DAMBE (Xia et al., 2003) i no es va obtenir saturació quan es consideraven tots els llocs o cada posició de codó per separat. Per a l'anàlisi ML, raxmlGUI v 1.3 (Silvestro i Michalak, 2012) es va executar amb 1000 rèpliques per obtenir els valors d'arrencada. MrBayes v. 3.2 (Ronquist et al., 2012) es va utilitzar per a l'anàlisi de BI. Les probabilitats posteriors bayesianes es van obtenir utilitzant tres cadenes escalfades i una cadena de fred per a dues curses separades, amb 1.000.000 de generacions cadascuna, realitzant un arbre cada 100 generacions. Es va obtenir un arbre de consens després de descartar el 25% de les primeres iteracions. L'arbre obtingut es va editar utilitzant Figtree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009).

2.5 Estimació del temps de divergència entre grups

Es va estimar els temps de divergència entre els grups de *X. montserratensis* utilitzant un enfocament bayesià implementat a BEAST 1.8.1 (Drummond et al., 2012). El model Yule va ser seleccionat com a model d'especiació, i es va emprar un rellotge relaxat exponencial sense correlació. Degut a la manca de fòssils de *X. montserratensis*, s'ha realitzat una anàlisi basada en el calibratge geogràfic. Com les Illes Balears presenten un elevat nombre d'espècies del gènere *Xerocrassa*, s'ha utilitzat un esdeveniment paleogeogràfic del Mediterrani Occidental com a punt de calibració per estimar els temps de divergència absoluta. Concretament, es va assignar 5.3 Ma per a l'edat del node que separava les espècies de *Xerocrassa* de les Illes Balears d'aquelles de la Península Ibèrica, seguint una estratègia semblant a Chueca et al. (2017). Es van

realitzar dues anàlisis independents durant 1×10^8 milions de generacions, amb un mostreig cada 10000 generacions. El Burn-in es va determinar amb Tracer 1.6 (Rambaut et al., 2014). Les dues anàlisis es van combinar i es va identificar l'arbre de màxima credibilitat mitjançant LogCombiner 1.8.1 i TreeAnnotator 1.8.1 (Drummond et al., 2012). L'arbre es va visualitzar amb FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Una prova de Mantel va examinar les correlacions entre la matriu de distància genètica entre poblacions (F_{st}) i la matriu de distàncies geogràfiques. Les distàncies geogràfiques entre parelles de poblacions es van calcular com la distància euclidiana en km entre cada dos llocs de mostreig. GenAlEx es va utilitzar per fer la prova Mantel amb 9999 permutacions per inferir la seva importància. Finalment, es van avaluar les barreres per al flux de gens entre localitats amb Alleles In Space (AIS) (Miller, 2005) utilitzant l'algorisme de la màxima diferència Monmonier i la interpolació del paisatge genètic. Les distàncies brutes i l'opció "pseudoslope", que corregien les distàncies genètiques amb les geogràfiques, es van utilitzar per identificar les barreres.

3. Resultats

3.1 Diversitat genètica

Hem genotipat 615 bp del COI a partir de 152 individus. En total es van identificar 33 haplotips diferents dels quals 30 eren haplotips privats només presents en una sola població (Taula S2, números d'adhesió de Genbank XXX). La diversitat genètica global va ser elevada tant en la diversitat total d'haplotips ($0,91 \pm 0,01$) com en la diversitat dels nucleòtids ($0,011 \pm 0,001$). La diversitat genètica va variar significativament entre localitats, segons la prova 2 desenvolupada per Salicru et al. (1993) tant en la diversitat d'haplotips ($X^2 = 44,82$, $P < 0,001$) com diversitat de nucleòtids ($X^2 = 57,28$, $P < 0,001$).

Montcau i Castellsapera van ser les localitats amb la riquesa al·lèlica, diversitat d'haplotips i diversitat de nucleòtids més altes. Els Munts i La Mola van ser les poblacions amb valors mitjans de diversitat genètica més baixos (Taula 1, Taula S3). La mètrica D de Tajima va revelar que la diversitat de totes les poblacions no es desvia de la neutralitat, tret de Sant Jeroni on era significatiu. Tanmateix, sembla que aquesta desviació no es deu a una expansió de la població, atès que els valors R_2 no són significatius (Taula 1).

Taula 1: Poblacions de *X. montserratensis* analitzades, valors de diversitat genètica i proves de neutralitat. (N) Nombre d'individus analitzats; (h) nombre d'haplotips, incloent el nombre d'haplotips privats entre parèntesis; (AR) riquesa al·lèlica per a una mostra de 12 individus; (Hd) diversitat d'haplotips \pm desviació estàndard; (Pi) diversitat de nucleòtids donada en % \pm desviació estàndard; (R_2) test de Ramos-Onsins i Rozas; * indica significació.

POBLACIÓ	CODI	N	h	AR	Hd	Pi (%)	Tajima's D	R_2
Sant Jeroni	JE	21	5 (5)	2.82	0.486 \pm 0.124	0.195 \pm 0.108	-1.962*	0.151
Montcau	MU	19	8 (8)	5.85	0.877 \pm 0.044	0.626 \pm 0.162	-1.119	0.146
Castellsapera	CA	20	9 (8)	5.79	0.832 \pm 0.063	0.649 \pm 0.155	-1.366	0.102
La Mola	LA	20	2 (1)	1.00	0.505 \pm 0.056	0.082 \pm 0.009	1.430	0.253
Gallifa	GA	13	3 (1)	2.00	0.410 \pm 0.154	0.088 \pm 0.036	-0.462	0.164
Sentmenat	SE	20	4 (1)	2.54	0.647 \pm 0.072	0.125 \pm 0.022	-0.244	0.133
Marina	MA	20	3 (1)	1.86	0.426 \pm 0.122	0.167 \pm 0.070	-0.832	0.103
Els Munts	EM	19	5 (5)	3.57	0.731 \pm 0.080	0.267 \pm 0.032	0.450	0.160

3.2 Diferenciació entre poblacions

Un AMOVA sense cap agrupació a priori va revelar que la diferenciació entre poblacions explicava que el 77,5% de la variació total i la resta de variació (22,5%) es va explicar per diferències entre les poblacions. En ambdós casos, les diferències van

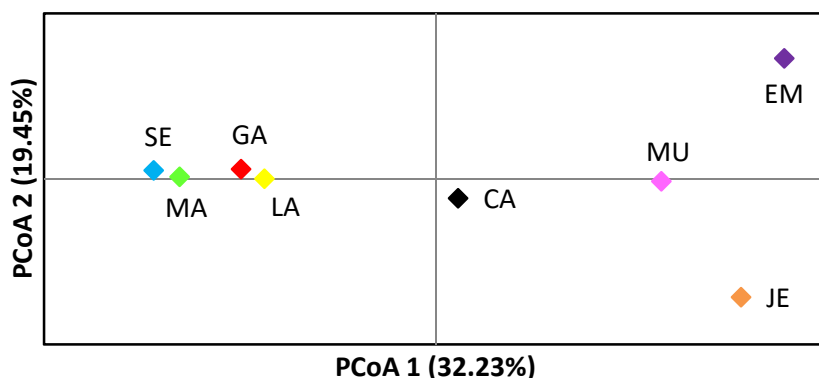
ser significatives ($P < 0,001$). Quan es van calcular les diferències genètiques entre parelles de poblacions (valors F_{st}), es va comprovar que totes elles eren altes i significatives després de la correcció de FDR, tret de la comparació entre Sentmenat i Gallifa (Taula 2).

Taula 2: Distàncies genètiques entre parelles de localitats de *Xerocrassa montserratensis*. Els valors F_{st} es mostren sota la diagonal mentre que els valors-P es mostren a dalt. Els valors $P < 0,013$ són significatius segons la correcció FDR. Codis de cada població com a la Taula 1.

	JE	MU	CA	LA	GA	SE	MA	EM
JE		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
MU	0.834		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CA	0.624	0.685		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LA	0.871	0.789	0.427		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
GA	0.865	0.758	0.525	0.641		0.019	<0.001	<0.001
SE	0.849	0.785	0.515	0.421	0.182		0.004	<0.001
MA	0.823	0.781	0.429	0.257	0.420	0.120		<0.001
EM	0.892	0.855	0.722	0.891	0.893	0.889	0.872	

Es va dur a terme una anàlisi de les coordenades principals per tenir una trama visual de la diferenciació de la població basada en les distàncies genètiques entre parelles de poblacions. Els dos primers eixos del PCoA van explicar el 51,68% de les diferències entre poblacions (Figura 3). Marina (MA), Sentmenat (SE), Gallifa (GA) i La Mola (LA) estaven relativament a prop, mentre que Montcau (MU), Sant Jeroni (JE) i Els Munts (EM) es van distribuir molt lluny de la resta. Castellsapera (CA) es va col·locar al mig, però també molt diferenciada de la resta (Figura 3).

Figura 3. Anàlisi de Coordenades Principals de les poblacions de *Xerocrassa montserratensis* basat en els valors de F_{st} entre parells de poblacions. Els codis són iguals que en la Taula 1.



3.3 Estructura filogeogràfica

La xarxa d'haplotips (Figura 4A) i l'arbre d'haplotips (Figura 4B) van mostrar el mateix patró, és a dir, quatre grups ben diferenciats. El grup 1 és central a la xarxa d'haplotips (Figura 4A), i inclou haplotips de cinc poblacions, i a més també comparteixen haplotips amb alguns cargols recollits a Sant Jeroni (grup 2) i Montcau (grup 4). Curiosament, el grup 1 conté haplotips de Marina, l'única població situada a prop de la costa. El grup 1 té una posició basal a l'arbre (Figura 4B), usant *X. cretica* com a grup extern, i inclou individus de les poblacions descrites com a *X. m. betulonensis* (Marina, Gallifa i Sentmenat).

A més, es van identificar tres grups d'haplotips diferents (grups 2, 3 i 4), ja que es diferenciaven del grup central per un nombre elevat de substitucions (quatre o més substitucions). El grup 2 estava compost per quatre haplotips que pertanyen exclusivament a la població de Sant Jeroni (Fig. 4B) i que també es concentren en l'arbre filogenètic amb suport de node alt (Figura 4A). Els haplotips d'aquest grup pertanyien a la subespècie *X. m. montserratensis*, ja que es van mostrejar a la mateixa localitat on havia estat descrita anteriorment aquesta subespècie. Els haplotips inclosos en el grup 3 també pertanyen a una sola població, Els Munts, i també s'agrupen en l'arbre d'haplotips. Pel que fa al grup 4, conté set haplotips de Montcau (una de les tres

poblacions situades al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt I l'Obac), molt diferenciat de la resta, i també conté un haplotip de Castellsapera degut a que en l'arbre filogenètic s'agrupa amb els cargols de Montcau amb un suport de node alt tant en els valors de bootstrap com de probabilitat posterior (Figura 4A). Aquest grup 4 conté tots els individus descrits com *X. m. delicatula*, ja que es van mostrejar a la mateixa localitat on es havia estat descrita anteriorment aquesta subespècie.

3.4 Marc temporal de *Xerocrassa montserratensis*

L'arbre estimat de *X. montserratensis* juntament amb sis espècies de les Illes Balears, i cinc espècies de la Península es mostra a la Figura 5. La separació entre els grups de *Xerocrassa* de les Illes Balears i la Península Ibèrica es va estimar en 7.47 Ma. Pel que fa a la Península Ibèrica, *X. montserratensis* i *X. chiae*, les dues espècies més properes en l'arbre calibrat, presenten una separació fa 4.04 Ma. L'edat de la divisió més antiga dins de *X. montserratensis* va ser datada en 1.91 Ma. (95% interval 0.84 – 3.19). Els tres grups d'haplotips/poblacions més clarament divergents del grup central (Figura 4) van presentar els següents temps de divergència (Figura 5): l'ancestre comú més recent de tots els haplotips dels Munts es de fa 0.40 Ma (95%: 0.08-0.84), els haplotips de Sant Jeroni que formen un grup monofilètic van divergir fa 0.33 Ma (95%: 0.06-0.74) i els del Montcau fa 0.65 Ma (95%: 0.17-1.24). En el cas dels individus del Montcau i de Sant Jeroni és interessant ressaltar que a les dues poblacions es va trobar un haplotip únic que formava part del grup central (Figura 4) amb temps de divergència entre 1-2 Ma (Figura 5).

Mitjançant una prova Mantel, la correlació entre les distàncies geogràfiques entre parells de poblacions i les seves distàncies genètiques era baixa i no significativa ($R^2 = 0,189$, $P = 0,099$), la qual cosa significa que les seves distàncies geogràfiques no

expliquen les distàncies genètiques entre poblacions. Segons la xarxa d'haplotips (Figura 4B), podem sospitar que les poblacions de Montcau (MU) i Marina (MA) eren excepcionals, ja que la seva diferenciació genètica no estava aparentment relacionada amb la seva distància respecte a altres poblacions (Figura 1). Per aquest motiu, es van repetir les proves de Mantel excloent aquestes dues poblacions. En aquest cas, les correlacions van ser més altes i significatives excloent tant MU ($R^2 = 0.355$, $P = 0.045$) com MA ($R^2 = 0.358$, $P = 0.003$). Finalment, la prova de Mantel sense cap de les dues poblacions esmentades (MU i MA) va mostrar una correlació alta i significativa ($R^2 = 0.561$, $P = 0.001$).

Basant-se en les distàncies genètiques brutes entre poblacions, es van inferir possibles barreres per al flux genètic utilitzant AIS. Mitjançant l'opció de l'algorisme de diferència màxima Monmonier, es van identificar dues barreres. La primera barrera separava la població de Els Munts (EM) de tota la resta, i la segona barrera separava la població de Montcau (MU) de la resta. Sorprenentment, en utilitzar "pseudoslopes", derivats com el quocient de les distàncies genètiques i geogràfiques per reflectir el canvi de composició genètica en relació amb el canvi de distància física, la primera barrera es va localitzar entre MU i tota la resta, mentre que la segona separava Castellsapera (CA) de la resta. Quan s'utilitza l'opció Forma del paisatge genètic Interpolate per visualitzar els patrons espacials de diversitat genètica amb "pseudoslòpes", es va obtenir un màxim diferenciat per a la zona de Montcau (Figura S4).

Figura 4: (A) Arbre bayesià d'haplotips inferit de les seqüències COI de *Xerocrassa montserratensis*. Les etiquetes corresponen al nom de cada haplotip. Els números dels nodes corresponen a valors de bootstrap (ML) / probabilitat posterior (BI) i només s'indiquen quan $P > 0.70$. La barra d'escala indica el nombre de substitucions per localitat. (B) Xarxa d'haplotips. El nombre de canvis de nucleòtids es dona quan és més gran que 2. La mida dels cercles és proporcional al nombre de seqüències amb el mateix haplotip. Els punts buits indiquen haplotips que falten. Les etiquetes identifiquen els noms dels haplotips i els colors indiquen les poblacions tal com es mostra a la llegenda.

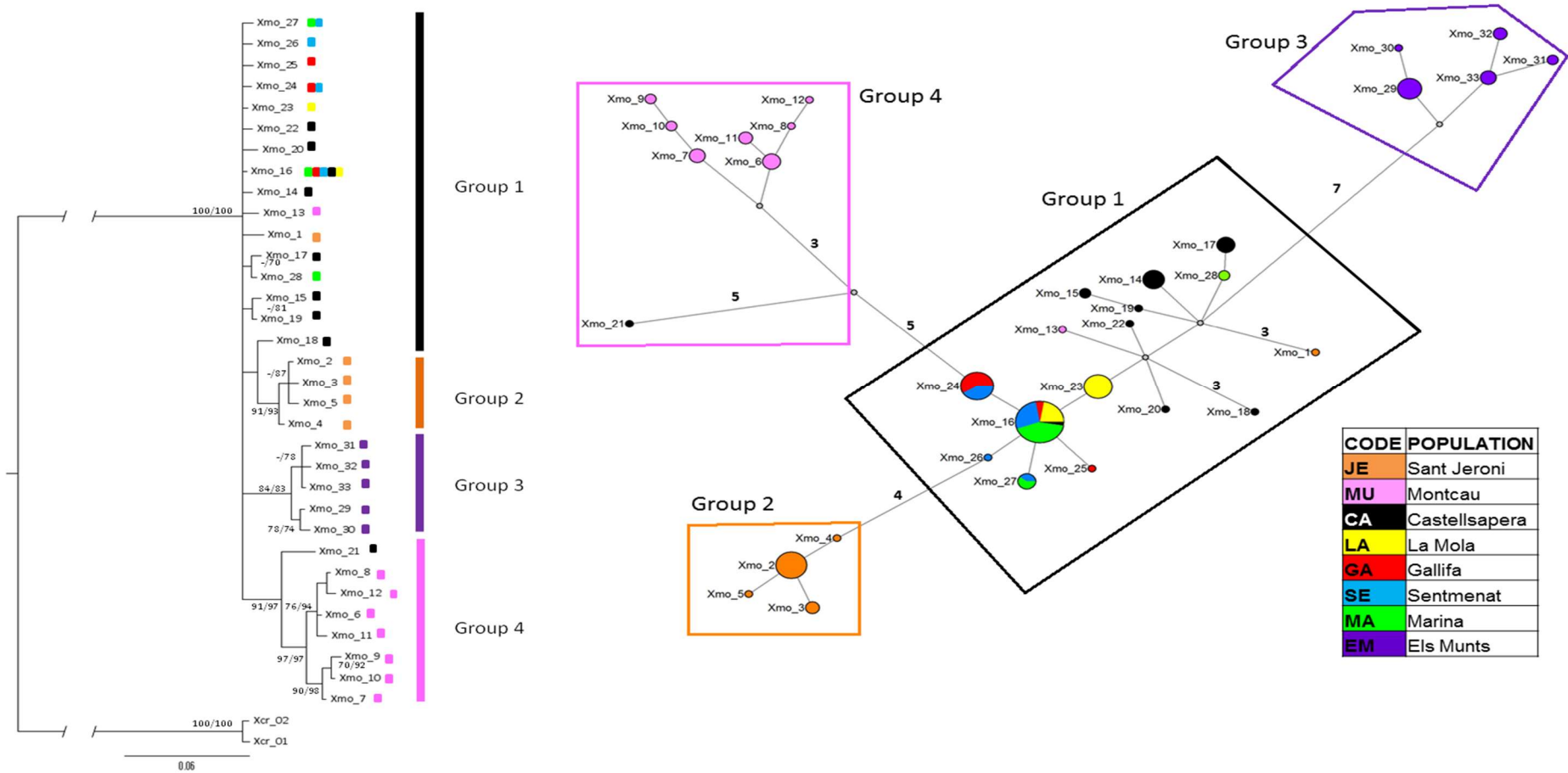
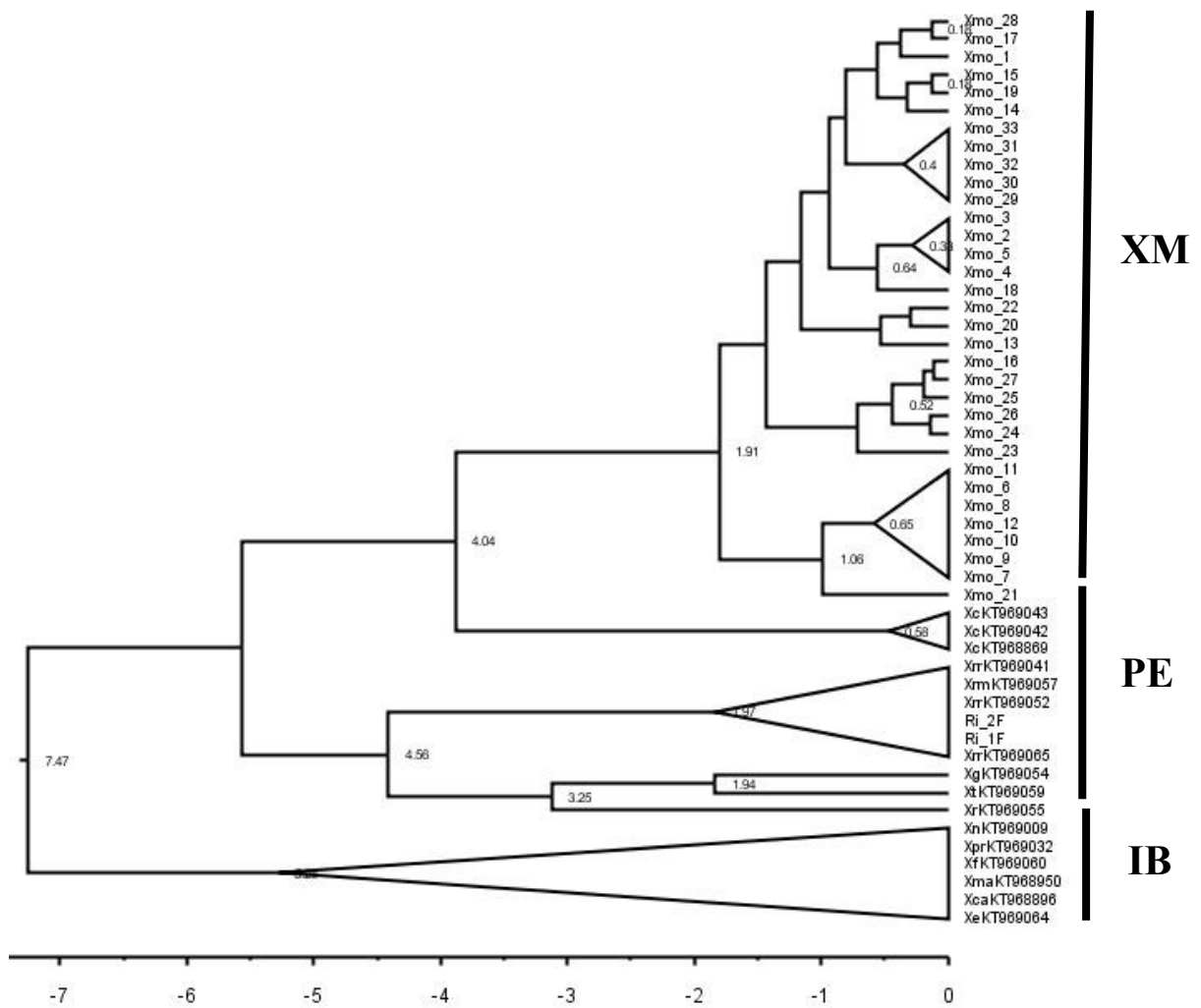


Figura 5. Arbre datat pels diferents grups d'haplotips de *Xerocrassa montserratensis* (XM) usant BEAST. El temps de divergència estimat en milions d'anys es dona pels nodes amb una probabilitat superior a 0,8. Alguns haplotips han estat colapsats per a millorar la visualització de les relacions entre grups. En l'arbre, les espècies de *Xerocrassa* de les Illes Balears utilitzades (IB) (noms de les espècies i codis de les seqüències del gen COI consultades en el genbank) van ser: *X. ebusitana* (XeKT969064), *X. caroli* (XcaKT968896), *X. majoricensis* (XmaKT968950), *X. frater* (XfKT969060), *X. nyeli* (XnKT969009), i *X. prietoi* (XprKT969032). En l'arbre, les espècies de *Xerocrassa* de distribució Peninsular utilitzades (PE) (noms de les espècies i codis de les seqüències del gen COI consultades en el gen bank) van ser: *X. chiae* (XcKT969043, XcKT969042, XcKT968869, XcKT9691, XcKT9692, XcKT968), *X. ripacurcica* (XrrKT969065, XrmKT969057, XrrKT969052, XrrKT969041, XrrKT9691, XrrKT9692, XrrKT9693, XrrKT9694), *X. roblesi* (XrKT969055), *X. geyeri* (XgKT969054) i *X. turolensis* (XtKT969059).



4. Discussió

En aquest treball hem estudiat per primera vegada el cargol endèmic català *Xerocrassa montserratensis* des d'un enfocament genètic. Hem detectat una diferenciació genètica significativa entre poblacions, fet que coincideix amb la nostra hipòtesi principal per a una espècie amb baixa mobilitat i alta especialització en l'hàbitat ocupat. La diferenciació observada entre poblacions es pot explicar en la majoria dels casos per aïllament per distància (Ursenbacher et al., 2010). No obstant això, en el nostre estudi, hi ha dos casos que es van desviar del patró general. L'alta diferenciació de Montcau només es pot explicar per barreres (històriques) per al flux genètic i un contacte secundari posterior, mentre que la baixa diferenciació a Marina només es pot explicar per una dispersió passiva recent.

4.1 Diversitat genètica i processos demogràfics

Comparat amb altres estudis genètics amb cargols terrestres (Kruckenhauser et al., 2014), les diversitats d'haplotips i de nucleòtids a *X. montserratensis* són elevades. Aquesta elevada diversitat genètica intrapoblacional es podria explicar per la fragmentació de l'hàbitat adequat i, com a conseqüència, un reduït flux genètic (Sauer et al., 2013). Per exemple, al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac, les codines estan aïllades i es distribueixen de manera irregular envoltades per boscos generalment d'alzina. En aquest escenari, la reforestació natural i el foc contrauen o amplien i connecten les codines (Santos et al., 2012), i aquest procés dinàmic pot donar forma a la diversitat genètica de les poblacions de *X. montserratensis*.

Per altre costat, les diferències en la diversitat genètica entre les vuit poblacions estudiades podrien estar relacionades amb l'extensió d'hàbitats adequats; de fet, Montcau i Castellsapera, les dues poblacions amb els valors més grans de diversitat

d'haplotips i nucleòtids, tenen les majors extensions de codines, mentre que La Mola tenia els valors més baixos de diversitat de nucleòtids probablement d'acord amb la petita extensió disponible de codines. Aquesta relació entre la fragmentació i extensió d'habitat adequat, amb la diversitat genètica suggereix que la disponibilitat de codines pot determinar la diversitat genètica a les poblacions de cargols.

4.2 Estructura genètica de la població

A escala regional, *X. montserratensis* té una distribució molt fragmentada amb múltiples taques aïllades que, juntament amb la baixa capacitat de dispersió de l'espècie, podria explicar l'elevada estructura genètica detectada en aquest estudi. El nostre estudi ha mostrat un patró semblant al que presenten les espècies de *Xerocrassa* de l'illa de Creta a causa de barreres de flux genètic i expansió de les poblacions (Sauer et al., 2013). En el nostre estudi, l'elevada diferenciació genètica a Sant Jeroni i Els Munts (dos dels grups detectats en la xarxa d'haplotips) es pot explicar pel model d'aïllament per distància, com es va confirmar amb la prova Mantel. Sant Jeroni està situat a la muntanya de Montserrat i està separat de la resta de poblacions pel riu Llobregat. Travessar la vall d'aquest riu, juntament amb la distància geogràfica entre les localitats més properes (Castellsapera i Sant Jeroni), pot representar una barrera natural que limita el flux entre ambdues poblacions. Aquest resultat constata que els rius poden representar barreres geogràfiques per a poblacions d'organismes animals (Peres et al., 1996). Pel que fa a Els Munts, aquesta és la població més perifèrica; l'existència d'hàbitats inadequats entre Els Munts i el nucli central de la distribució poden actuar com a barreres i aïllament geogràfic.

No obstant això, l'escenari filogeogràfic és més complex pel que fa a l'explicació de l'estructura genètica de les poblacions de Marina i Montcau, evidenciant

que el model d'aïllament per distància no es pot aplicar sempre i calen explicacions alternatives per entendre la història evolutiva de *X. montserratensis*. En el cas de Montcau, sorprenen les elevades diferències genètiques en comparació amb les poblacions més properes (a només 3 km de distància de Castellsapera i La Mola). Aquesta situació es pot explicar per una fragmentació històrica i un contacte secundari posterior, una situació ja proposada en altres estudis de cargols terrestres. Per exemple, Watanabe i Chiba (2001) van suggerir que la fragmentació i el contacte secundari es podien deure a canvis del nivell del mar, i Pfenninger et al. (2002) van mostrar que el contacte secundari podia aparèixer després de la glaciació. Curiosament, Sauer et al. (2013) van trobar elevades distàncies genètiques entre poblacions properes a *X. mesostena* de l'illa de Creta a causa de barreres geogràfiques. Altres estudis també han trobat una elevada diversitat genètica en espècies de cargols terrestres amb una distribució geogràfica reduïda (Ursenbacher et al., 2010; Madeira et al., 2017). Tots aquests exemples suggereixen que les distàncies genètiques altes entre poblacions properes de cargols són un patró freqüent encara que l'escenari geogràfic i històric pot canviar entre les espècies.

Els períodes de divergència entre grups d'haplotips de *X. Montserratensis* són de fa ~2 Ma. La divergència del grup d'haplotips del Montcau data d'aquest període si s'agrupa amb l'haplotip Xmo_21 trobat únicament a Castellsapera. Els períodes de divergència dels haplotips dels Munts i de Sant Jeroni del grup central són difícils d'establir perquè els nodes no estan ben suportats. Dins de cada grup el temps de coalescència dels haplotips és semblant i situats en el Pleistocè. Les glaciacions del Pleistocè podrien haver estat responsables d'aïllament poblacional i els períodes interglacials afavorit les expansions de les poblacions i la creació de nous haplotips malgrat sembla que no s'hagi recuperat el flux gènic a nivell de DNA mitocondrial. En

alguns casos com Els Munts i Sant Jeroni, proposem que possibles barreres degut a l'activitat geomorfològica d'erosió i sedimentació en la regió (García Castellanos et al., 2003) podrien haver mantingut aïllades les poblacions de Els Munts i Sant Jeroni respecte el nucli central de la distribució. En canvi, l'activitat geomorfològica podria haver permès la recuperació del flux i l'establiment de contacte secundari. Aquest fet s'hauria pogut produir entre la població de Montacu i la resta de poblacions del Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac, on la continuïtat de codines semblen garantir el contacte i flux entre poblacions que històricament haurien estat aïllades.

El nostre estudi també dona suport a l'existència de grans esdeveniments de dispersió recent, ja que la població de Marina va mostrar un patró oposat respecte a això observat a Montcau. Mentre que la distància genètica entre Marina i les poblacions centrals de *X. montserratensis* és baixa, la distància geogràfica és alta (cal recordar que Marina és l'única població localitzada a la Serra Litoral Catalana. Aquest patró només es pot explicar per una recent colonització i, atès que les capacitats de dispersió d'aquesta espècie són molt limitades, es probable que aquesta colonització fos el resultat d'una dispersió passiva. Basant-se en la similitud morfològica de la closca, Bofill (1898) ja tenia la hipòtesi que els cargols de Marina provenien de les poblacions de la Serralada Prelitoral Catalana per dispersió passiva per la conca hidrogràfica del riu Besòs. La ubicació de Gallifa i Sentmenat aigües amunt de Marina confirma ara, gràcies als resultats amb marcadors moleculars, les conclusions fetes per Bofill (1898) publicades fa més de 100 anys. La presència de fòssils de *X. montserratensis* que es troben lluny de la distribució actual (per exemple, Rubí, a 20 km del parc natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac) podrien ser evidències de dispersió passiva en altres zones de la regió (Bofill, 1898). Malgrat la seva baixa mobilitat, s'ha documentat la dispersió passiva d'alguns cargols terrestres (Dörge et al., 1999; Hausdorf, 2000; Aubry

et al., 2006; Dahirel et al., 2014; Kramarenko, 2014; Neiber et al., 2016), com a mecanismes que poden augmentar les capacitats de dispersió del cargol terrestre per colonitzar noves àrees (Aubry et al., 2006). L'absència de diferenciació genètica entre Marina i les suposades poblacions origen d'aquesta dispersió poden explicar-se pel fet que es tracti d'un' esdeveniment de colonització recent.

4.3 Estat de la subespècie genètica a *Xerocrassa montserratensis*

Xerocrassa montserratensis va ser descrita per primera vegada per Hidalgo a la muntanya de Montserrat el 1870. Posteriorment, l'espècie va rebre diferents revisions taxonòmiques, de vegades contradictòries.

- La forma nominal *X. m. montserratensis* (Hidalgo, 1870) es troba exclusivament a la muntanya de Montserrat, sent Sant Jeroni la localitat on es va descriure l'espècie.

- *X. m. betulonensis* (Bofill, 1879) és una subespècies situada a Marina, Gallifa i altres localitats de la Serralada prelitoral de Catalana. Alguns autors van reclamar la consideració específica d'aquesta subespècie a partir de caràcters morfològics (per exemple, Altimira, 1971; Puente, 1994). No obstant això, Martínez-Ortí & Bros, (2017) va concloure que aquests arguments per elevar *X. m. betulonensis* al nivell d'espècie no eren vàlids.

- *X. m. delicatula* (Bofill, 1898) és una subespècies restringida a la zona del Montcau en el Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac. Aquesta subespècie va ser considerada recentment com un sinònim menor de *X. montserratensis* (Martínez-Ortí i Bros, 2017 i Martínez-Ortí et al., 2018).

- La població de *X. montserrantesis* dels Munts és la més allunyada del nucli central de la distribució. Es troba a les Guilleries (Serralada Transversal Catalana) i

morfològicament té una closca més arrodonida amb un marge carinat menys marcat que en altres poblacions estudiades. Aquesta població mai no s'ha assignat a cap subespècie.

Malgrat les diferències morfològiques en la forma i la mida de la closca entre les diferents poblacions de *X. montserratensis*, Martínez-Ortí i Bros (2017) van publicar recentment que els caràcters morfo-anatòmics de la closca i del sistema reproductor no es poden utilitzar per discriminar els taxons subespecífics descrits fins ara. Els nostres resultats genètics només suporten parcialment la delimitació de les subespècies fins ara descrites. Per exemple, els individus de Gallifa, Sentmenat i Marina serien assignats al mateix grup genètic (és a dir, grup *betulonensis*), confirmant l'estudi morfològic de Bofill (1879, 1898). No obstant això, els nostres resultats genètics indiquen que aquestes poblacions no estarien separades genèticament d'altres poblacions tradicionalment considerades com *X. m. montserratensis* (p. ex. poblacions de Castellsapera i La Mola en el Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac). A més, es va detectar una barreja moderada d'haplotips del gen mitocondrial COI; per exemple, a Montcau, un individu va presentar un haplotip (Xmo_13) del grup central 1, similar als haplotips d'individus de La Mola i Castellsapera. Els canvis fenotípics no sempre coincideixen amb els genètics, ja que poden ser el resultat de la plasticitat o convergència fenotípica (Funk, i Omland, 2003). Per aquest motiu, s'han d'utilitzar altres marcadors polimòrfics nuclears, com microsatèl·lits o SNPs, per revelar el flux genètic entre els individus de les poblacions estudiades per confirmar la hipotètica subespècie. En el cargol de terra *Murella muralis*, Fiorentino et al. (2013) van trobar una estructura genètica alta a una escala espacial molt fina usant microsatèl·lits, encara que la mateixa diferenciació no sempre es va mantenir amb els marcadors d'ADN nuclear i mitocondrial.

En resum, es conclou que la nostra filogeografia basada en les seqüències del gen COI només suporta parcialment la delimitació subespecífica dissenyada fa 100 anys. El nostre estudi coincideix amb altres treballs de cargols terrestres pel fet que la taxonomia històrica basada en caràcters morfològics de la closca i la filogeografia basada en marcadors moleculars no sempre coincideix (Liu et al., 2003; Dépraz et al., 2009; Proćków et al., 2017). Aquesta divergència entre morfologia i filogeografia es pot deure a l'existència de llinatges evolutivament divergents però morfològicament críptics.

4.4 Conservació i perspectives futures

Els estudis filogeogràfics són molt útils per donar suport a la conservació de la biodiversitat, ja que contribueixen a augmentar el coneixement d'espècies amenaçades (Sinclair et al., 2005), mitjançant la identificació d'Unitats Significativament Evolutives (ESU) o Unitats de Gestió (MU) dins de les espècies (Holanda & Hadfield, 2002; Gómez-Moliner et al., 2009). Els estudis filogeogràfics ja han ajudat a delimitar els plans de conservació d'espècies de cargols de terra endèmics i amenaçats (Holanda, i Hadfield, 2002; Sauer i Hausdorf, 2010; Sauer et al., 2013). Pel que fa al nostre estudi, els grups genèticament diferenciats de *X. montserratensis* es podrien considerar diferents ESU i estan parcialment relacionats amb la classificació subespecífica basada en dades morfològiques. A més, els nostres resultats suggereixen l'existència d'un ESU prèviament desconeguts, a la població d'Els Munts (Massís de les Guilleries) que es podria elevar a nivell subespecífic en una futura revisió taxonòmica.

Com es va esmentar a la UICN, *X. montserratensis* és un cargol amenaçat (Martínez-Ortí, 2011). El fet que hàgim trobat una estructuració elevada implica que no només es necessita la protecció de l'espècie en conjunt, sinó també la protecció de cada

ESU. Tot i que l'espècie viu majoritàriament en algun parc natural protegit, els plans de conservació es basen principalment en la flora i la fauna vertebrada. Aquest estudi es pot utilitzar per posar més èmfasi en aquest tipus de fauna (els invertebrats no artròpodes), que normalment tenen menys interès per part de les institucions de conservació.

5. Agraïments

Agraïm a Àngel Miño, Adrià Fàbrega, Mireia Vila i Jordi Calaf que han donat un suport logístic per a realitzar el mostreig de cargols en els parcs naturals. El permís de captura de mostres va ser concedit pel Servei de Fauna i Flora de la Subdirecció General de Biodiversitat i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya.

6. Bibliografia

- Altimira, C., 1971. Notas malacológicas. Contribución al conocimiento de la fauna malacológica terrestre y de agua dulce de Cataluña. *Miscel·lània Zoològica*, 3(1): 7–10.
- Armbruster G., Hofer M., Baur B. 2007. Effect of cliff connectivity on the genetic population structure of a rock-dwelling land snail species with frequent self-fertilization. *Biochem. Sys. Ecol.* 35: 325–333.
- Aubry, S.; Labaune, C.; Magnin, F.; Roche, P. , Kiss, L. 2006. Active and passive dispersal of an invading land snail in Mediterranean France. *Journal of Animal Ecology* 75: 802-813.
- Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.

- Avise, J.C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard university press.
- Bahl A., Pfenninger M., Bamberger H., Frye M., Streit B. 1996. Survival of snails in fragmented landscapes. In: Settele J., Margules C., Poschlod P., Henle K., eds. Species survival in fragmented landscapes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 329-343
- Bank, R. A.; Neubert, E. 2017. Checklist of the land and freshwater Gastropoda of Europe. MolluscaBase. Last update: July 16th, 2017.
<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=sourcedetails&id=279050>
- Bandelt, H.-J.; Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16: 37-48.
- Basnou, C., Alvarez, E., Bagaria, G., Guardiola, M., Isern, R., Vicente, P., Pino, J., 2013. Spatial patterns of land use changes across a mediterranean metropolitan landscape: Implications for biodiversity management. *Environmental Management*, 52: 971-980.
- Baur, B. 1986. Patterns of dispersion, density and dispersal in alpine populations of the land snail *Arianta arbustorum* (L.) (Helicidae). *Holarctic Ecology* 9:117-125.
- Baur, B. 1993. Population structure, density, dispersal and neighbourhood size in *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (Pulmonata: Helicidae). *Annalen des Naturhistorischen Museums Wien* 94/95B: 307–321.
- Bofill, A., 1879. Catálogo de los moluscos testáceos terrestres del llano de Barcelona. *Crónica Científica*, 3: 1–24.
- Bofill, A. 1898. *La Helix montserratensis*. Su origen y su distribución en el tiempo y en el espacio. *Memorias de la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona Tomo II*.

- Bros, V. 2011. Composició de la comunitat de mol·luscs de les codines en el Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac, i l'impacte del trepig i l'erosió en el Montcau. *Monografies de Sant Llorenç del Munt i l'Obac*, 7: 43-52
- Bros, V. 2013. Les comunitats de mol·luscs terrestres del Parc de la Serralada de Marina (Serralada Litoral Catalana, Barcelona): aportacions per a la gestió i la conservació. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, 77: 81–94.
- Chueca L.J., Madeira M^a.J. & Gómez-Moliner B., 2015. Biogeography of the land snail genus *Allognathus* (Helicidae): middle Miocene colonization of the Balearic Islands. *Journal of Biogeography*, 42: 1845–1857.
- Chueca LJ, Gómez-Moliner BJ, Forés M, Madeira MJ. 2017. Biogeography and radiation of the land snail genus *Xerocrassa* (Geomitridae) in the Balearic Islands. *Journal of Biogeography* 44: 760–772. <https://doi.org/10.1111/jbi.12923>
- Cuttelod, A., García, N., Abdul Malak, D., Temple, H. Katariya, V. 2008. The Mediterranean: a biodiversity hotspot under threat. In: J.-C. Vié, C. Hilton-Taylor and S.N. Stuart (eds). *The 2008 Review of The IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN Gland, Switzerland Dahirel M, Olivier E, Guiller A, Martin MC, Madec L,
- Ansart A. 2014. Movement propensity and ability to correlate with ecological specialization in European land snails: comparative analysis of a dispersal syndrome. *J Anim Ecol* 84: 228–238
- Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R. , Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9: 772-772.
- Davison, A. 2002. Land snails as a model to understand the role of history and selection in the origins of biodiversity. *Population Ecology* 44: 0129-0136.

- Davison, A. & Clarke, B. 2000. History or current selection? A molecular analysis of 'area effects' in the land snail *Cepaea nemoralis*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 267: 1399-1405.
- Dépraz, A.; Hausser, J. , Pfenninger, M. 2009. A species delimitation approach in the *Trochulus sericeus/hispidus* complex reveals two cryptic species within a sharp contact zone. BMC evolutionary biology 9: 171.
- Dörge, N.; Walther, C.; Beinlich, B., Plachter, H. 1999. The significance of passive transport for dispersal in terrestrial snails (Gastropoda, Pulmonata). Zeitschrift für Ökologie und Naturschutz 8: 1-10.
- Drummond, A., Suchard, M., Xie, D. , Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution, 29, 1969-1973.
- Ezzine IK, Pfarrer B, Dimassi N, Said K, Neubert E. 2017 At home at least: the taxonomic position of some north African *Xerocrassa* species (Pulmonata, Geomitridae). ZooKeys 712: 1–27.
- Excoffier, L.; Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary bioinformatics online 1: 47.
- Fehér, Z, Major, Á. , Krízsik, V. 2013. Spatial pattern of intraspecific mitochondrial diversity in the Northern Carpathian endemic spring snail, *Bythinella pannonica* (Frauenfeld, 1865) (Gastropoda: Hydrobiidae), Organisms Diversity & Evolution, 13, 4, (569)
- Fiorentino, V.; Manganelli, G.; Giusti, F.; Tiedemann, R. , Ketmaier, V. 2013. A question of time: the land snail *Murella muralis* (Gastropoda: Pulmonata) reveals constraints on past ecological speciation. Molecular ecology 22: 170-186.

- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* 3: 294-299.
- Funk, D.J. & Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*: 397-423.
- Garcia-Castellanos, D.; Vergés, J.; Gaspar-Escribano, J. , Cloetingh, S. 2003. Interplay between tectonics, climate, and fluvial transport during the Cenozoic evolution of the Ebro Basin (NE Iberia). *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* (1978–2012) 108.
- Gomez-Moliner, B.; García, M.J.M.; Caravaca, M.A.E.; Garrido, M.T.C.; González, A.R.; Chueca, L.J.; Vergara, M. , Aguirre, O.R. 2009. Los estudios del ADN como apoyo a la biología de la conservación de la fauna. *Revista internacional de los estudios vascosRIEV* 54: 351-386.
- Greve, C., M. Haase, R. Hutterer, D. Rödder, F. Ihlow , B. Misof. 2017. Snails in the desert: Species diversification of *Theba* (Gastropoda: Helicidae) along the Atlantic coast of NW Africa. *Ecology and Evolution* 7: 5524 - 5538.
- Guiller, A., , L. Madec. 2010. Historical biogeography of the land snail *Cornu aspersum*: a new scenario inferred from haplotype distribution in the Western Mediterranean basin. *BMC Evolutionary Biology* 10: 18.
- Guiller, A., M.-C. Martin, C. Hiraux, , L. Madec. 2012. Tracing the invasion of the Mediterranean land snail *Cornu aspersum aspersum* becoming an agricultural and garden pest in areas recently introduced. *PLoS ONE* 7: e49674.

- Guindon, S. , Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology* 52: 696-704.
- Haig, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*, pp. 95-98.
- Harl, J., Páll-Gergely, B., Kirchner, S., Sattmann, H., Duda, M., Kruckenhauser, L. , Haring, E. 2014. Phylogeography of the land snail genus *Orcula* (Orculidae, Stylommatophora) with emphasis on the Eastern Alpine taxa: speciation, hybridization and morphological variation. *BMC Evolutionary Biology*, 14: 223.
- Haase M, Misof B, Wirth T, Baminger H , Baur B. 2003. Mitochondrial differentiation in a polymorphic land snail: evidence for Pleistocene survival within the boundaries of permafrost – *J. Evol. Biol.* 16: 415-42.
- Hausdorf, B. 2000. Biogeography of the Limacoidea sensu lato (Gastropoda: Stylommatophora): vicariance events and long-distance dispersal. *Journal of Biogeography*, 27, 379–390.
- Hausdorf, B. , Sauer, J. 2009. Revision of the Helicellinae of Crete (Gastropoda: Hygromiidae). - *Zoological Journal of the Linnean Society* 157: 373-419.
- Hickerson, M.; Carstens, B.; Cavender-Bares, J.; Crandall, K.; Graham, C.; Johnson, J.; Rissler, L.; Victoriano, P. , Yoder, A. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291-301.
- Holland, B.S. , Hadfield, M.G. 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology* 11: 365-375.

- Hurt, C.; Anker, A. , Knowlton, N. 2009. A multilocus test of simultaneous divergence across the Isthmus of Panama using snapping shrimp in the genus *Alpheus*. *Evolution* 63: 514-530.
- Knowles, L.L. , Maddison, W.P. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623-2635.
- Kokshoorn, B. , Gittenberger, E. 2012. Phylogeography of the land snail *Abida secale* (Draparnaud, 1801) (Chondrinidae). *Journal of Molluscan Studies* 78: 128-133.
- Kramarenko (2014) Active and passive dispersal of terrestrial mollusks: a review. *Ruthenica* 24: 1–14.
- Kruckenhauser, L.; Duda, M.; Bartel, D.; Sattmann, H.; Harl, J.; Kirchner, S. & Haring, E. 2014. Paraphyly and budding speciation in the hairy snail (Pulmonata, Hygromiidae). *Zoologica scripta* 43: 273-288.
- Lázaro, E.M.; Harrath, A.H.; Stocchino, G.A.; Pala, M.; Baguña, J. , Riutort, M. 2011. *Schmidtea mediterranea* phylogeography: an old species surviving on a few Mediterranean islands? *BMC evolutionary biology* 11: 274.
- Librado, P. , Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liu H-P, Hershler R, Clift K 2003. Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cryptic diversity within a western American springsnail. *Molecular Ecology* 12: 2771–2782.
- Lydeard, C., R.H. Cowie, W.F. Ponder, A.E. Bogan, P., Bouchet, S.A. Clark, K.S. Cummings, T.J. Frest, O., Gargominy, D.G. Herbert, R. Hershler, K.E. Perez, B., Roth, M. Seddon, E.E. Strong , F.G. Thompson .2004. The Global Decline of Non-marine Molluscs. *BioScience* 54: 321–330

- Madeira PM, Chefaoui RM, Cunha RL, Moreira F, Dias S, Calado G, Castilho R. 2017. High unexpected genetic diversity of a narrow endemic terrestrial mollusc. *PeerJ* 5:e3069; DOI 10.7717/peerj.3069
- Martínez-Ortí, A. 2011. *Xerocrassa montserratensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T22254A9368348. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T22254A9368348.en>. Downloaded on 04 June 2018.
- Martínez–Ortí, A. , Uribe, F., 2008. Los ejemplares tipo de las colecciones malacológicas del Museu de Ciències Naturals de Barcelona y del Museu Valencià d’Història Natural. *Arxius de Miscel·lània Zoològica*, 6: 1–156.
- Martínez–Ortí, A., Bros, V., 2017. Taxonomic clarification of three taxa of Iberian geomitrids, *Helix montserratensis* Hidalgo, 1870 and subspecies (Gastropoda, Pulmonata), based on morpho–anatomical data. *Animal Biodiversity and Conservation*, 40.2: 247-267
- Martínez–Ortí, A., Prieto, M., Uribe, F., 2018. Addendum to the type catalogue of the malacological collection in the Museu de Ciències Naturals de Barcelona. *Arxius de Miscel·lània Zoològica*, 16: 40–95.
- Medail, F., Quezel, P. 1999. Biodiversity hotspots in the Mediterranean Basin: setting global conservation priorities. *Conservation Biology* 13: 1510–1513.
- Miller, M. 2005. Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Moreira, F., Calado, G., Dias, S., 2015. Conservation status of a recently described endemic land snail, *Candidula coudensis*, from the Iberian Peninsula. *PLoS ONE* 10 (9), e0138464. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0138464>.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GA, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for onservation priorities. *Nature*, 403: 853–858.

- Narum, S.R. 2006. Beyond Bonferroni: less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics* 7: 783-787.
- Neiber MT, Sagorny C, Sauer J, Walther F, Hausdorf B. 2016. Phylogeographic analyses reveal Transpontic long distance dispersal in land snails belonging to the *Caucasotachea atrolabiata* complex (Gastropoda: Helicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 103: 172–183.
- Otero, I., Marull, J., Tello, E., Diana, G. L., Pons, M., Coll, F. & Boada, M. 2015. Land abandonment, landscape, and biodiversity: questioning the restorative character of the forest transition in the Mediterranean. *Ecology and Society*, 20(2): 7.
- Parcerisas, L., Marull, J., Pino J., Tello, E., Coll, F. , Basnou, C. 2012. Land use changes, landscape ecology and their socioeconomic driving forces in the Spanish Mediterranean coast (El Maresme County, 1850–2005). *Environmental Science & Polici*, 23:123–132.
- Peakall, R. ,Smouse, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Peres, C.; Patton, J. da Silva, N.F. 1996. Riverine barriers and gene flow in Amazonian saddle-back tamarins. *Folia Primatologica* 67: 113-124.
- Petit, R.J.; El Mousadik, A. Pons, O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation biology* 12: 844-855.
- Pfenniger, M., Posada, D. 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): Fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56(9): 1776–1788

- Pfenninger, M.; Posada, D., Shaw, K. 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56: 1776-1788.
- Proćków, M., Strzała, T., Kuźnik-Kowalska, E., Proćków, J. and P. Mackiewicz. 2017. Ongoing Speciation and Gene Flow between Taxonomically Challenging *Trochulus* Species Complex (Gastropoda: Hygromiidae). *PLoS ONE*, 12(1): e0170460.
- Puente, A. I., 1994. Estudio taxonómico y biogeográfico de la superfamilia Helicoidea Rafinesque, 1815 de la Península Ibérica e Islas Baleares. Ph. D. Thesis, Universidad del País Vasco, Bilbao
- Rambaut, A. 2009. Tree Figure Drawing Tool, Version 1.3. 1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, USA.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution* 19: 2092-2100.
- Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61: 539-542.
- Salicru, M.; Menendez, M.; Morales, D., Pardo, L. 1993. Asymptotic distribution of (h, ϕ)-entropies. *Communications in Statistics-Theory and Methods* 22: 2015-2031.
- Santos, X.; Bros, V., Miño, À. 2009. Recolonization of a burned Mediterranean area by terrestrial gastropods. *Biodiversity and Conservation* 18: 3153-3165.
- Santos, X.; Bros, V., Ros, E. 2012. Contrasting responses of two xerophilous land snails to fire and natural reforestation. *Contrib Zool* 81: 167-180.

- Sauer, J. , Hausdorf, B. 2009. Sexual selection is involved in speciation in a land snail radiation on Crete. *Evolution* 63: 2535-2546.
- Sauer, J. , Hausdorf, B. 2010. Reconstructing the evolutionary history of the radiation of the land snail genus *Xerocrassa* on Crete based on mitochondrial sequences and AFLP markers. *BMC evolutionary biology* 10: 299.
- Sauer J, Hausdorf B. A. 2012. comparison of DNA-based methods for delimiting species in a Cretan land snail radiation reveals shortcomings of exclusively molecular taxonomy. *Cladistics*: 28: 300–316.
- Sauer, J.; Oldeland, J. , Hausdorf, B. 2013. Continuing fragmentation of a widespread species by geographical barriers as initial step in a land snail radiation on Crete. *PloS one* 8: e62569.
- Schweiger O, Frenzel M, Durka W. Spatial genetic structure in a metapopulation of the land snail *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Helicidae). *Mol Ecol.* 2004;13: 3645–3655. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02357.x
- Silvestro, D. , Michalak, I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* 12: 335-337.
- Sinclair, E.A., Pérez-Losada, M., Crandall, K.A. 2005. Molecular phylogenetics for conservation biology. In *Phylogeny and conservation*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 19–56.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. , Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28: 2731-2739.

- Torre, I., Bros, V. , Santos, X. 2014. Assessing the impact of reforestation on the diversity of Mediterranean terrestrial Gastropoda. *Biodiversity and Conservation*, 23: 2579–2589.
- Ursenbacher S., Alvarez C., Armbruster G. F. J., Baur B. 2010. High population differentiation in the rock-dwelling land snail (*Trochulus caelatus*) endemic to the Swiss Jura Mountains. *Conserv. Genet.* 11: 1265–1271.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10592-009-9956-3>
- Welter-Schultes F 2012 *European non-marine molluscs, a guide for species identification*. Planet Poster Editions, Göttingen
- Watanabe, Y. , Chiba, S. 2001. High within-population mitochondrial DNA variation due to microvicariance and population mixing in the land snail *Euhadra quaesita* (Pulmonata: Bradybaenidae). *Molecular Ecology* 10: 2635-2645.
- Xia, X.; Xie, Z.; Salemi, M.; Chen, L. , Wang, Y. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular phylogenetics and evolution* 26: 1-7.

MATERIAL SUPLEMENTARI

Taula S1: Localització de les poblacions mostrejades de *Xerocrassa montserratensis*, acònims i nombre d'individuals capturats per localitat (N).

POPULATION	CODE	N	LATITUDE	LONGITUDE	ALT. (m)	Township
Sant Jeroni	JE	21	41° 36' 13"	1° 49' 06"	1100	Monistrol de Montserrat
Montcau	MU	19	41° 40' 22"	2° 00' 05"	1000	Mura
Castellsapera	CA	20	41° 38' 47"	1° 58' 23"	910	Terrassa
La Mola	LA	20	41° 42' 17"	2° 07' 27"	1050	Matadepera
Gallifa	GA	13	41° 56' 03"	2° 21' 55"	950	Gallifa
Sentmenat	SE	20	41° 38' 55"	2° 07' 16"	600	Sentmenat
Marina	MA	20	41° 28' 04"	2° 13' 18"	125	Sta Coloma de Gramenet
Els Munts	EM	19	41° 38' 41"	2° 01' 03"	848	Vilanova de Sau

Taula S2: Freqüència dels 33 haplotips de *X. montserratensis*. Els haplotips compartits per més d'una població estan marcats en gris. Acròmis com en la taula S1.

	JE	MU	CA	LA	GA	SE	MA	EM
Xmo_01	1							
Xmo_02	15							
Xmo_03	3							
Xmo_04	1							
Xmo_05	1							
Xmo_06		5						
Xmo_07		4						
Xmo_08		1						
Xmo_09		2						
Xmo_10		2						
Xmo_11		3						
Xmo_12		1						
Xmo_13		1						
Xmo_14			7					
Xmo_15			2					
Xmo_16			1	8	2	10	15	
Xmo_17			5					
Xmo_18			1					
Xmo_19			1					
Xmo_20			1					
Xmo_21			1					
Xmo_22			1					
Xmo_23				12				
Xmo_24					10	7		
Xmo_25					1			
Xmo_26						1		
Xmo_27						2	3	
Xmo_28							2	
Xmo_29								9
Xmo_30								1
Xmo_31								2
Xmo_32								3
Xmo_33								4
Total	21	19	20	20	13	20	20	19

Taula S3: Valor Z de les comparacions per parelles de poblacions en la diversitat haplotípica (per sota de la diagonal) i diversitat nucleotídica (per sobre la diagonal) segons el procediment de contrast d'hipòtesis de Salicru et al. (1993). Les diferències significatives estan en negreta. Els valors positius per sota de la diagonal indiquen que la diversitat haplotípica és superior en la població de la columna, I si són negatius indica que la diversitat haplotípica és superior per la població de la fila. Per les comparacions de diversitat nucleotídica (sota la diagonal) el raonament és a l'inrevés.

	JE	MU	CA	LA	GA	SE	MA	EM
JE		-2.214	-2.403	1.043	0.940	0.635	0.218	-0.639
MU	-2.975		-0.103	3.353	3.242	3.064	2.601	2.174
CA	-2.487	0.594		3.652	3.526	3.347	2.834	2.414
LA	-0.144	5.222	3.871		-0.162	-1.809	-1.204	-5.565
GA	0.382	2.915	2.532	0.580		-0.877	-1.004	-3.716
SE	-1.127	2.724	1.925	-1.558	-1.395		-0.572	-3.657
MA	0.341	3.476	2.952	0.588	-0.082	1.560		-1.299
EM	-1.662	1.601	0.988	-2.312	-1.848	-0.777	-2.088	

Figura S4. Combinació de les coordenades espacials (eixos X i Y) amb la diferenciació genètica a través de l'espai (eix Z). El pic blau indica nivells elevats de diferenciació genètica al voltant de la població de Montcau.

