



FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES

**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*

Redescubrimiento y caracterización molecular de una  
población de *Cephalota (Taenidia) deserticoloides*  
(Coleoptera: Cicindelidae),  
escarabajo tigre endémico de la provincia de Alicante



TRABAJO FINAL DE GRADO CIENCIAS AMBIENTALES

ALBERTO VALERO SÁNCHEZ

2018

Tutores: Alejandro López López y María Trinidad León Quinto

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Área de Zoología

Universidad Miguel Hernández

## RESUMEN

---

*Cephalota (Taenidia) deserticoloides* (Coleoptera, Cicindelidae) es una especie endémica de escarabajo tigre presente en el sureste ibérico, asociada a un hábitat de estepa hipersalina. El objetivo de este trabajo consiste en caracterizar molecularmente una población de esta especie, presente en la provincia de Alicante y recientemente redescubierta. Para ello se realizarán dos tipos de análisis. Uno filogeográfico, basado en un fragmento del gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa. Otro filogenético, para tratar de clarificar las relaciones entre esta especie y el resto de especies del género *Cephalota*. Como trabajo previo, se llevó a cabo un muestreo en localidades donde estaba citada y en zonas con existencia de hábitat potencial. Se secuenció el ADN mitocondrial de todos los ejemplares para la construcción de una red de haplotipos, revelándose las relaciones entre la población redescubierta en el Vinalopó y las otras localidades conocidas. La relación cercana entre las poblaciones de San Isidro y el Vinalopó podría explicarse por su antigua conexión a lo largo del litoral de la antigua Albufera de Elche. Además, un análisis filogenético junto con secuencias de otras especies del género *Cephalota* permitió confirmar las relaciones previamente establecidas entre los taxones de este grupo. Con los resultados de este trabajo, se incrementa el conocimiento que se tiene sobre la historia y relaciones de las diferentes poblaciones de *C. deserticoloides*, pudiendo establecer diversas hipótesis que llevan a una misma conclusión: debido a la presión sobre su hábitat, las poblaciones están muy fragmentadas y reducidas, lo que supone una grave amenaza para la supervivencia de este endemismo.

## ABSTRACT

---

*Cephalota (Taenidia) deserticoloides* (Coleoptera, Cicindelidae) is an endemic tiger beetle species present in the Southeast Iberia, associated with hypersaline steppe habitats. The aim of this work is to molecularly characterize a population of this species, present in the province of Alicante and recently rediscovered. Two types of analysis will be carried out. A phylogeographic one, based on the mitochondrial cytochrome oxidase first subunit gene. Another phylogenetic one, to try to clarify the relationship between this species and the rest of species of *Cephalota*. Sampling was carried out in localities where it was cited and also in areas with potential habitat. After sequence a fragment of mitochondrial DNA from all the specimens collected, an haplotype network was built, revealing the relationships between the rediscovered population in Vinalopó River and the other known localities. The close relationship between the populations of San Isidro and Vinalopó may be explained by their ancient connection along the coastline of the ancient Elche Lagoon. In addition, the phylogenetic analysis, together with sequences from other species of the genus *Cephalota*, confirmed the

previously established relationships among the taxa of this group. With the information of this work, the knowledge about the history and relationships of the different populations of *C. deserticoloides* is increased, which allow us to propose diverse hypotheses that lead to the same conclusion: due to the pressure on their habitat, the populations are very fragmented and reduced, which is a serious threat to the survival of this endemism.

**Palabras clave:** *Cephalota deserticoloides*, Coleoptera, Filogeografía, Filogenia, Conservación.



## AGRADECIMIENTOS

---

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que han tenido la paciencia de aguantarme en estos más de 6 años de carrera, sobre todo a mi familia y en especial a mis padres, que siempre han estado animándome cuando más lo he necesitado. Nunca supe el rumbo de mi vida y no hice nada con la certeza de saber que era lo correcto, pero pasado este tiempo puedo mirar atrás y decir con rotundidad que lo mejor que hice fue “meterme a estudiar Ambientales en Elche”. Aquí es donde entran el profesorado y mis compañeros, ya que es por culpa de ellos que estos años han marcado un antes y un después en mi vida.

Por tanto, gracias a todos aquellos profesores de la UMH que muestran día a día, clase a clase y práctica a práctica que el amor por tu profesión es un pilar fundamental para no ser infeliz. Y sobre todo, gracias de corazón por la paciencia, que es mucha, y por no deshumanizar al estudiante. Además, gracias a mis compañeros de clase por todos los buenos momentos, las risas, los apuntes rulados, los ánimos, los llantos y por la experiencia del geocampamento. Me llevo varias amistades para toda la vida, y eso no tiene precio.

Además, gracias a mis tutores Trini y Alejandro, por su paciencia, por contagiarme el amor por lo que hacen, por la tranquilidad que me han transmitido para hacer este trabajo, por estar siempre disponibles para atender mis dudas, por ayudarme en todo momento y por las salidas a pleno sol para capturar los “bichos”. Así, hacer el TFG ha sido mucho más llevadero. Y por supuesto, gracias al Área de Biología Animal de la Universidad de Murcia por los datos aportados y por su soporte técnico.

Por último, recordar a mi abuelo Tomás, que nos dejó este año. Sin él, una parte de mí se apagó, pero también encontré la fuerza necesaria para terminar el grado. Va por ti, abuelo.

# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD.....	1
1.1.1. Utilidad del ADN nuclear. PCR.....	1
1.1.2. Utilidad del ADN mitocondrial.....	2
1.1.3. Filogenia .....	3
1.1.4. Filogeografía.....	5
1.2. CICINDÉLIDOS .....	6
1.2.1. Coleópteros: características generales.....	6
1.2.2. Cicindélidos en la península Ibérica: distribución, riqueza y características .....	7
1.2.3. Género <i>Cephalota</i> : <i>Cephalota</i> deserticoloides.....	8
<b>2. ANTECEDENTES, OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE PARTIDA.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL.....	12
3.2. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN .....	13
3.3. SECUENCIACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS .....	14
3.4. CONSTRUCCIÓN DE LAS MATRICES .....	15
3.5. ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO.....	15
3.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	15
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
5.1. DIVERSIDAD GENÉTICA EN <i>CEPHALOTA DESERTICOLOIDES</i> .....	21
5.2. HISTORIA EVOLUTIVA DE <i>CEPHALOTA DESERTICOLOIDES</i> .....	21
5.3. RELACIONES DE LA POBLACIÓN DEL VINALOPÓ CON OTRAS POBLACIONES.....	23
5.4. FILOGENIA DE <i>CEPHALOTA DESERTICOLOIDES</i> .....	24
5.5. IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA CONSERVACIÓN DE LA ESPECIE ..	25
<b>6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....</b>	<b>26</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>FIGURA 1:</b> Partes de un árbol filogenético.....	4
<b>FIGURA 2:</b> Ejemplo de representación de un análisis filogeográfico.....	6
<b>FIGURA 3:</b> Diversidad en el patrón de colores de distintas especies de Cicindelidae .....	8
<b>FIGURA 4:</b> Vista dorsal y lateral de <i>C. deserticoloides</i> , fotografías de J. Herrera .....	10
<b>FIGURA 5:</b> Hábitat potencial de <i>C. deserticoloides</i> .....	10
<b>FIGURA 6:</b> Localizaciones en el mapa donde se han recolectado ejemplares de <i>C. deserticoloides</i> .....	12
<b>FIGURA 7:</b> Resultado de la electroforesis en gel de agarosa .....	14
<b>FIGURA 8:</b> Captura de pantalla del programa Geneious con las muestras alineadas .....	14
<b>FIGURA 9:</b> Árbol filogenético obtenido con el programa MRBAYES.....	18
<b>FIGURA 10:</b> Árbol filogenético obtenido mediante el programa IQTREE .....	19
<b>FIGURA 11:</b> Red filogeográfica donde se indican la red de los distintos haplotipos obtenidos .....	20
<b>FIGURA 12:</b> Planteamiento de la diversidad genética de las poblaciones de <i>C. deserticoloides</i> .....	22
<b>FIGURA 13:</b> Antigua Albufera de Elche y distribución de las poblaciones de San Isidro y del río Vinalopó .....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>TABLA 1:</b> Lisrado de ejemplares de <i>C. deserticoloides</i> utilizados para este estudio .....	12
---	----

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD

#### 1.1.1. Utilidad del ADN nuclear. PCR

El ADN es uno de los marcadores más utilizados para el estudio de la biodiversidad. Se han desarrollado un gran número de técnicas adecuadas a diferentes situaciones, que permiten obtener una gran cantidad de información de esta molécula (Jiménez, 2000). La secuenciación de ADN a gran escala, procedente de conjuntos de especies, proporciona los medios para cuantificar la diversidad genética de los miembros de una comunidad (Baselga *et al.*, 2013).

Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en genética y en biología molecular, teniendo infinidad de aplicaciones debido a su sencillez. La PCR es un método rápido y versátil (Saiki *et al.*, 1988) que permite copiar secuencias específicas de ADN mediante una serie de reacciones *in vitro*, y así amplificar secuencias diana de ADN presentes en cantidades infinitesimales entre una población de otras moléculas de ADN (Klug y Cummings, 2006).

Esta sucesión de reacciones es bastante simple. Intervienen tres segmentos de ADN: el segmento de doble cadena que se quiere amplificar (ADN molde o patrón), y dos pequeños fragmentos de cadena sencilla, llamados cebadores o primers. Éstos son oligonucleótidos diseñados específicamente para la región de interés, que tienen secuencia complementaria con los extremos flanqueantes del ADN patrón a los que se unen. Además, participan en esta reacción la enzima Taq ADN polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), sales y un tampón (Rodríguez-Tarduchy, 2007).

El proceso consta de ciclos de tres reacciones controladas en tiempo y temperatura por un termociclador (Eberhard, 2007):

- Desnaturalización del ADN de cadena doble, a 93-95°C para el ADN genómico humano.
- Hibridación o anillamiento del cebador a unos 45-70°C, que depende de la temperatura de fusión esperada del dúplex ADN (temperatura de hibridación).

- Elongación de ADN, que utiliza una ADN polimerasa termorresistente (proviene de microorganismos termófilos como *Thermophilus aquaticus*, Taq polimerasa), a unos 70-75°C.

Es una reacción en cadena porque las hebras de ADN de nueva síntesis sirven a su vez de molde para reacciones de síntesis de ciclos posteriores. Tras unos 30 ciclos, la PCR habrá generado unas  $10^5$  copias de la secuencia diana específica, cantidad que puede ser fácilmente detectada tras electroforesis en gel como una banda discreta de un tamaño específico (Strachan *et al.*, 1996).

La PCR presenta una serie de ventajas notorias:

- Rapidez y facilidad: Permite clonar ADN en pocas horas utilizando equipos relativamente poco sofisticados.
- Sensibilidad: Puede amplificar secuencias a partir de cantidades prácticamente indetectables de ADN diana, incluso de una sola célula.
- Robustez: Permite la amplificación de secuencias específicas de material muy degradado, mezclado con otros materiales o incluidas en algún medio como el ámbar. (Strachan *et al.*, 1996; Klug y Cummings, 2006).

Sin embargo, también presenta ciertas desventajas o limitaciones:

- Se debe de tener información sobre la secuencia de nucleótidos del DNA diana.
- Cualquier contaminación de la muestra con ADN de otras fuentes puede causar problemas.
- Necesita realizarse en paralelo con controles adecuados cuidadosamente diseñados (Klug y Cummings, 2006).

### **1.1.2. Utilidad del ADN mitocondrial**

Una herramienta que ha demostrado ser de gran utilidad para estudiar la filogeografía y filogenia entre especies próximas es el ADN mitocondrial (Awise, 2000). La importancia de esta molécula en este ámbito se debe a una serie de características que la diferencian del ADN nuclear:

- Carece de regiones de ADN repetitivo, intrones, pseudogenes, transposones y demás secuencias que puedan influir en estos estudios.

- Se encuentra en gran número en cada una de las células; esto permite obtener mejores resultados al extraer el ADN o amplificarlo mediante PCR.
- Es de herencia uniparental (materna), por lo que no presenta recombinación (Awise *et al.*, 1987).
- Su tasa de mutación es diez veces superior a la del ADN nuclear (Hewitt, 2004), requiriendo menor tiempo evolutivo para que la diferenciación entre linajes quede reflejada en esta molécula.

Sin embargo, también presenta una serie de desventajas que cuestionan su idoneidad y limitan su utilidad (Galtier *et al.*, 2009):

- Debido a su elevada tasa de mutación, se llega rápidamente a la saturación de las secuencias; es decir, pueden producirse múltiples mutaciones en la misma posición nucleótida, fenómeno conocido como homoplasia.
- La presencia de diferentes poblaciones mitocondriales en un mismo individuo, procedentes de ambos progenitores, puede interferir en los resultados. Este fenómeno se conoce como heteroplasma (Awise *et al.*, 1987).
- Mayor sensibilidad a los procesos de selección (Hey, 1997).

### 1.1.3. Filogenia

Los cambios en la estructura genética de las poblaciones producen, con el paso del tiempo, la especiación y la divergencia genética de esas poblaciones. Con esto, se deberían poder utilizar las diferencias genéticas entre las especies actuales para reconstruir sus historias evolutivas (Klug y Cummings, 2013). La filogenia se encarga de ello, ya que consiste en establecer las relaciones evolutivas (parentesco) entre los componentes de un grupo de organismos (Pierce, 2014).

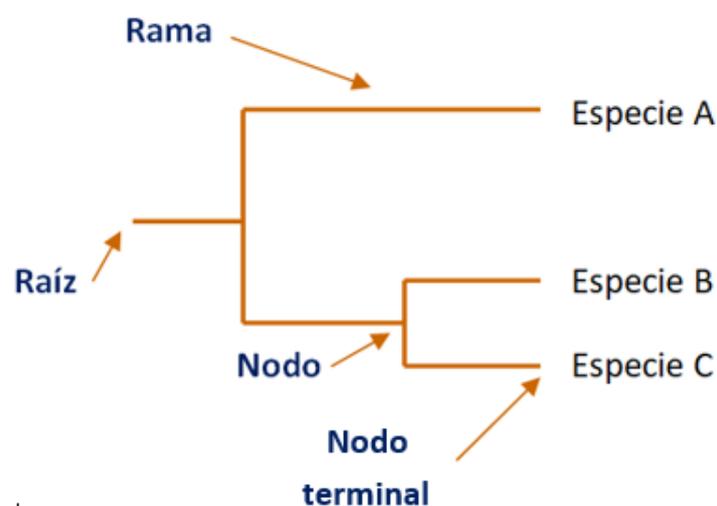
Puesto que los genomas evolucionan por acumulación gradual de mutaciones, el grado de diferenciación de la secuencia nucleotídica entre dos genomas debería indicar cuánto tiempo hace que esos dos genomas divergieron, es decir, cuándo vivió su ancestro común. Así, es de esperar que dos genomas con un ancestro común muy antiguo presenten más diferencias que otros dos genomas con un ancestro común más reciente. Por tanto, la comparación entre tres o más genomas permitiría establecer sus relaciones evolutivas (Brown, 2008).

Para representar dichas relaciones evolutivas se utilizan los árboles filogenéticos, que están compuestos por los siguientes elementos:

- Rama: Representan las conexiones evolutivas entre los organismos y su longitud puede representar el tiempo de especiación o grado de divergencia entre ellos (Klug y Cummings, 2013; Pierce, 2014).
- Raíz: Cuando un nodo interno representa un ancestro común a todos los demás nodos del árbol, se dice que el árbol tiene raíz (Pierce, 2014).
- Nodo: Muestran los eventos de divergencia entre los diferentes linajes.
- Nodo terminal: Representan las especies vivas (Klug y Cummings, 2013).

En el árbol se incluyen los llamados grupos externos, que son organismos relacionados con el grupo de estudio, pero no pertenecientes a él, para así “enraizar” el árbol.

En la actualidad, es común el uso de los datos de las secuencias de ADN de los organismos para construir los árboles filogenéticos. Sin embargo, para ello se deben identificar genes homólogos y alinear sus bases nucleotídicas. Este proceso se lleva a cabo mediante programas que se han diseñado para procesar toda la información y que establecen probabilidades sobre qué tipos de cambio son más susceptibles de producirse (Pierce, 2014).



**Figura 1:** Árbol filogenético en forma de dendrograma, que representa las relaciones evolutivas de un conjunto de especies, en el que se indican cada una de sus partes.

#### 1.1.4. Filogeografía

La filogeografía se define, en sentido estricto, como el análisis espacial de los linajes génicos (Avice *et al.*, 1987). Esta disciplina aplica el análisis de las genealogías génicas para estudiar cómo han evolucionado las poblaciones y así poder sacar conclusiones con respecto a determinados procesos, como la colonización, la diversificación y la extinción de linajes génicos en áreas determinadas. (Lanteri y Confalonieri, 2003).

El análisis filogeográfico tiene múltiples aplicaciones: obtener respuestas sobre el origen de ciertas especies que han llegado a colonizar una isla o archipiélago volcánico; averiguar vías de dispersión de ciertas especies que son consideradas plagas agrícolas (Roderick y Gillespie, 1998; Scataglini *et al.*, 2000); el reconocimiento de poblaciones en peligro de extinción (Moritz, 1995; Avice, 1996); o qué tipo de especiación se ha producido para que existan distintos tipos de morfismo en una misma especie (Bernatchez y Dodson, 1990), entre muchas otras.

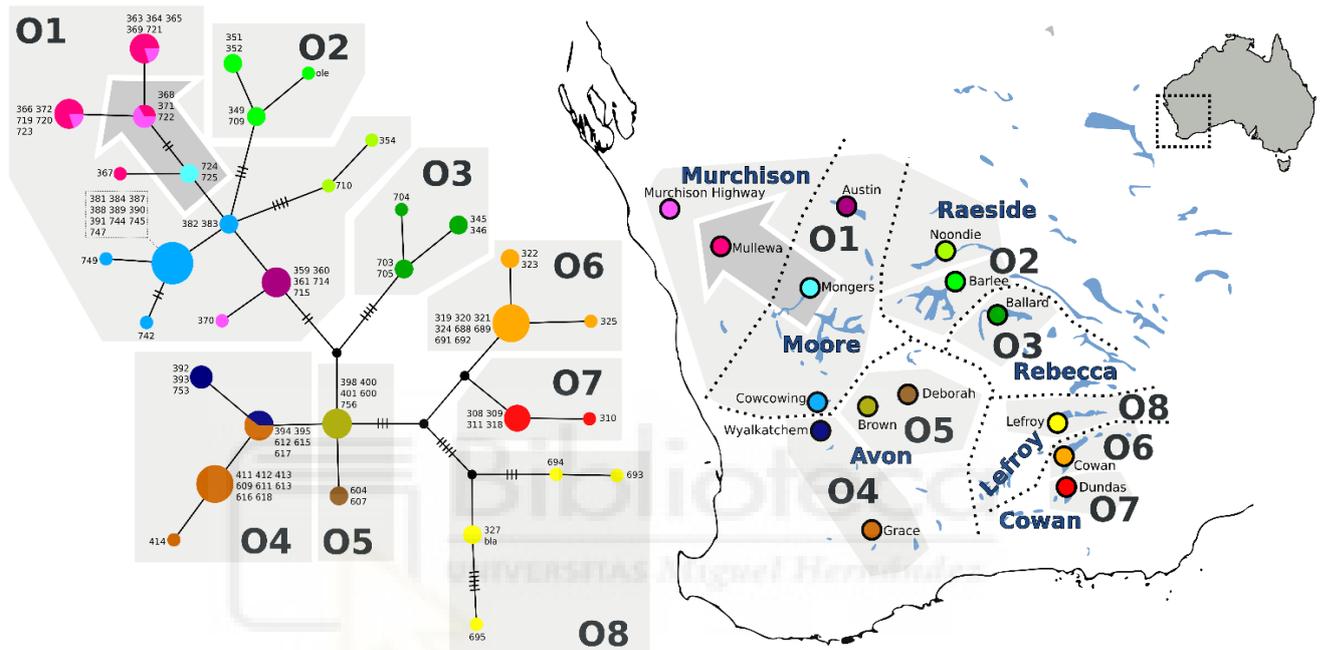
Al estimar el flujo génico entre individuos de una población e individuos de distintas poblaciones, los métodos tradicionales de la genética no consideraban los factores históricos. Sin embargo, los estudios filogeográficos permiten identificar patrones que indican la existencia de barreras antiguas al flujo genético. (Vázquez-Domínguez, 2009).

Una de las aplicaciones más amplias, consiste en determinar el grado de estructuración poblacional de una especie a lo largo de su área de distribución, así como descifrar qué procesos han ocurrido o han podido ocurrir que han determinado dicha distribución. Este enfoque establece un balance entre dispersión y fragmentación del hábitat, puesto que son procesos totalmente distintos, para explicar las causas históricas de la distribución y permite identificar factores como extinciones y recolonizaciones o eventos de expansión del área geográfica (Lanteri y Confalonieri, 2003).

La representación de un análisis filogeográfico se denomina red filogeográfica, que muestra una red de haplotipos y las relaciones entre ellos. Cuando un haplotipo sufre una mutación, surge un nuevo haplotipo, que se separa del primero. Esta separación se indica con una línea que une ambos haplotipos y con una serie de símbolos representando el número de pasos mutacionales que diferencian estos haplotipos. Si un haplotipo está

rodeado de muchos otros, se obtiene un patrón en forma estrella. Normalmente, al observar este tipo de patrón, se asume que los haplotipos que rodean al central han derivado de él.

Un haplotipo es una secuencia de nucleótidos única y es una de las herramientas más comunes en filogeografía. Los individuos con haplotipos idénticos estarán más estrechamente relacionados entre sí (Gehring *et al.*, 2012).



**Figura 2:** Ejemplo de representación de un análisis filogeográfico (López-López *et al.*, 2016). Cada círculo representa un haplotipo hallado, unidos por líneas y con nodos indicando los pasos mutacionales ocurridos que no han sido encontrados en el muestreo. El tamaño de los círculos es proporcional a la cantidad de individuos muestreados con cada haplotipo. Los colores indican la localización en la que se han encontrado los haplotipos.

## 1.2. CICINDÉLIDOS

### 1.2.1. Coleópteros: características generales

Los coleópteros reciben el nombre común de escarabajos. Este grupo de insectos ha colonizado ampliamente todos los medios, a excepción del mar abierto, por lo que constituye el grupo de animales con mayor éxito evolutivo (Alonso-Zarazaga, 2015). Tanto es así que el número de distintas especies de coleópteros que se han descrito en el planeta varía entre 360.000 y 400.000, si bien se estima mundialmente alrededor de 1.100.000, lo que hace que sea un orden increíblemente diverso (Chapman, 2009).

La palabra proviene de los términos griegos “*koleos*”, que significa vaina o envoltura, y “*pteron*”, que significa ala. Esto es debido a que la característica principal del orden es la

modificación del primer par de alas, denominadas élitros, que están dispuestas de forma que, en reposo, cubren totalmente el segundo par de alas membranosas.

Dentro del orden de los coleópteros se distinguen cuatro subórdenes: Adephaga, Myxophaga, Archostemata y Polyphaga. En el suborden Adephaga se enclava la familia de los escarabajos tigre (Cicindelidae).

### 1.2.2. Cicindélidos en la península Ibérica: distribución, riqueza y características

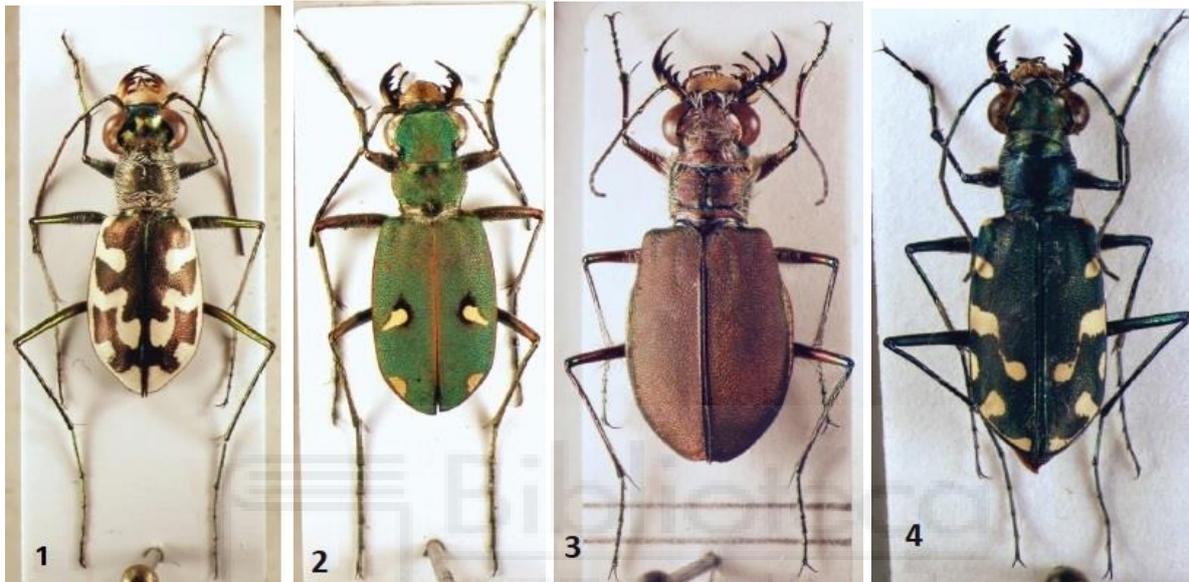
Hasta hace unos años se consideraba a la familia Cicindelidae como una subfamilia de los carábidos (Carabidae), pero un estudio actual ha revelado que constituyen una familia separada de éstos (López-López y Vogler, 2017), resultado que ha sido confirmado por otros trabajos (Zhang *et. al.* 2018).

Actualmente se han descrito más de 2.700 especies de cicindélidos ([www.carabidae.org](http://www.carabidae.org)) repartidas prácticamente por todo el planeta, a excepción de ciertos ambientes difícilmente colonizables como la Antártida, el Ártico por encima de 65° de latitud, Tasmania y ciertas islas oceánicas como Hawái y las Maldivas. En cuanto a su distribución por altitud, se pueden encontrar en rangos desde los -250 m a los 3500 m, si bien hay cierta heterogeneidad en cuanto a su distribución (Cassola y Pearson, 2000). Por ejemplo, en la región Indomalaya se han descrito 753 especies, siendo la región con mayor riqueza, en contraste con la región Paleártica, donde se han descrito 131 especies. (Pearson y Cassola, 2005). Este grupo de coleópteros presenta una gran diversidad morfológica y en cuanto a sus patrones de coloración (**Fig. 3**) (Pearson y Vogler, 2001).

Poseen alas que principalmente utilizan para escapar de sus depredadores, así como patas largas y delgadas que les permiten alcanzar velocidades muy altas en relación con su tamaño, para poder cazar a sus presas con relativa facilidad (Kamoun y Hogenhout, 1996). Una vez atrapan la presa, la mastican con los molares para, a continuación, verter una serie de enzimas del intestino medio que ayudan a su digestión. Por ello, son animales que ingieren el alimento en forma líquida (Pearson *et al.*, 1988).

Las características más notorias que diferencian a las cicindelas de otros grupos de Adephaga son:

1. Largas mandíbulas en forma de hoz.
2. Dientes simples alineados en el borde interior de la mandíbula con un agregado (molar) en la porción interior proximal de cada una.
3. Cuerpo alargado, con cabeza y ojos más anchos que el tórax.
4. Patas marchadoras largas y delgadas.
5. Comportamiento constructor de túneles de la larva.



**Figura 3:** Diversidad en el patrón de color de varias especies de la familia Cicindelidae: **1** *Cephalota littorea*; **2** *Homodela Ismenia*; **3** *Calomera concolor*; **4** *Calomera alboguttata*.

En la península Ibérica se pueden encontrar 22 especies de escarabajo tigre repartidas prácticamente en la totalidad del territorio (Serrano, 2013). Esta familia de coleópteros es interesante para los entomólogos debido a su amplia distribución, su especialización dentro de un hábitat restringido y su fácil observación y manipulación (Pearson y Cassola, 1992). Sin embargo, estos factores no son suficientes para que funcionen por sí solos como bioindicadores, por lo que para que tengan esa utilidad, se evalúan junto con otros grupos de taxones de otros niveles de la cadena trófica (Pearson y Vogler, 2001).

### 1.2.3. Género *Cephalota*: *Cephalota deserticoloides*

Dentro de la familia Cicindelidae, se encuentra el género *Cephalota*, grupo halófilo (Hieke, 1983) para el que se han descrito 21 especies a nivel mundial (Wiesner, 1992). En la

península Ibérica este género cobra vital importancia debido a la presencia de tres endemismos característicos: *C. dulcinea*, *C. hispanica* y *C. deserticoloides*.

Este género forma un clado monofilético, distinguiéndose dentro de él dos grupos: uno compuesto por las especies *C. atrata*, *C. chiloleuca*, *C. circumdata*, *C. elegans*, *C. littorea* y *C. zarudniana*; y otro agrupando a *C. deserticoloides*, *C. hispanica*, *C. dulcinea* y *C. besseri*. En cuanto al primero, *C. zarudniana* diverge en una posición basal, mientras que los pares formados por *C. atrata* y *C. chiloleuca* y por *C. circumdata* y *C. elegans* se ramifican dentro del clado. Con respecto al segundo grupo, *C. besseri* es especie hermana del clado formado por *C. dulcinea* y *C. hispanica*, ocupando *C. deserticoloides* una posición basal (Herrera, 2018)

De estos tres endemismos, destaca la especie *Cephalota deserticoloides* debido a que se encuentra en zonas mucho más restringidas y presenta una especial afinidad por zonas altamente áridas (saladares del sublitoral), encontrándose únicamente en algunas localidades en Murcia y del sur de Alicante (Codina, 1931; Diogo *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2003). Debido a su escasa presencia, entre otros factores, esta especie está incluida y catalogada en el Libro Rojo de los Invertebrados de España como vulnerable (Verdú *et al.*, 2011).

*C. deserticoloides* se considera actualmente especie perteneciente al subgénero *Taenidia* (Rivalier, 1950; Lorenz, 2005), representado en la península Ibérica por otras tres especies: *C. circumdata*, *C. littorea* y *C. dulcinea*.

En cuanto a su morfología, presenta una longitud que varía entre los 9 y 11 mm, siendo las hembras generalmente más grandes. Los élitros presentan coloración cobriza parda con manchas de color marfil. El rasgo más identificativo con otras especies que son prácticamente idénticas en morfología es la presencia de pilosidad que recubre la cabeza además de las patas (López *et al.*, 2006) (**Fig. 4**).



**Figura 4:** Vistas dorsal y lateral de dos ejemplares de *C. deserticoloides*. Fotografías de J. Herrera.



**Figura 5:** Desembocadura del río Vinalopó. Hábitat potencial de *C. deserticoloides*, caracterizado por la presencia de suelos salinos y matorrales halófilos asociados.

## 2. ANTECEDENTES, OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE PARTIDA

En el año 1999 se publicaron ocho poblaciones existentes (Diogo *et al.* 1999). Esas poblaciones se encontraban en las localidades de La Alcanara (Alhama, Murcia), Arneva (Orihuela, Alicante), San Isidro (Alicante), Rambla de Ajauque (Fortuna, Murcia), Albaterra (Alicante), Elche (Alicante), Santa Pola (Alicante) y Totana (Murcia). Sin embargo, durante repetidos muestreos a lo largo de los últimos años, únicamente se han hallado ejemplares en Rambla Salada (Fortuna, Murcia), Alhama (Murcia) y San Isidro (Alicante). Pese a que se citó la existencia de una población en el término de Elche (Vives y Vives, 1978; Diogo *et al.*, 1999), no se había vuelto a encontrar hasta la realización de este trabajo, durante el cual se ha podido constatar su existencia y localización exacta.

El objetivo de este trabajo consiste en caracterizar molecularmente esta población de la especie *Cephalota (Taenidia) deserticoloides* de la provincia de Alicante, recientemente redescubierta. Nuestra hipótesis de partida es que esta población está genéticamente relacionada con la población conocida presente en San Isidro, previamente caracterizada genéticamente (López-López y Galián, 2010; Herrera, 2018), debido a la proximidad geográfica entre las poblaciones y a que ambas pertenecían al ámbito de la desaparecida albufera de Elche.

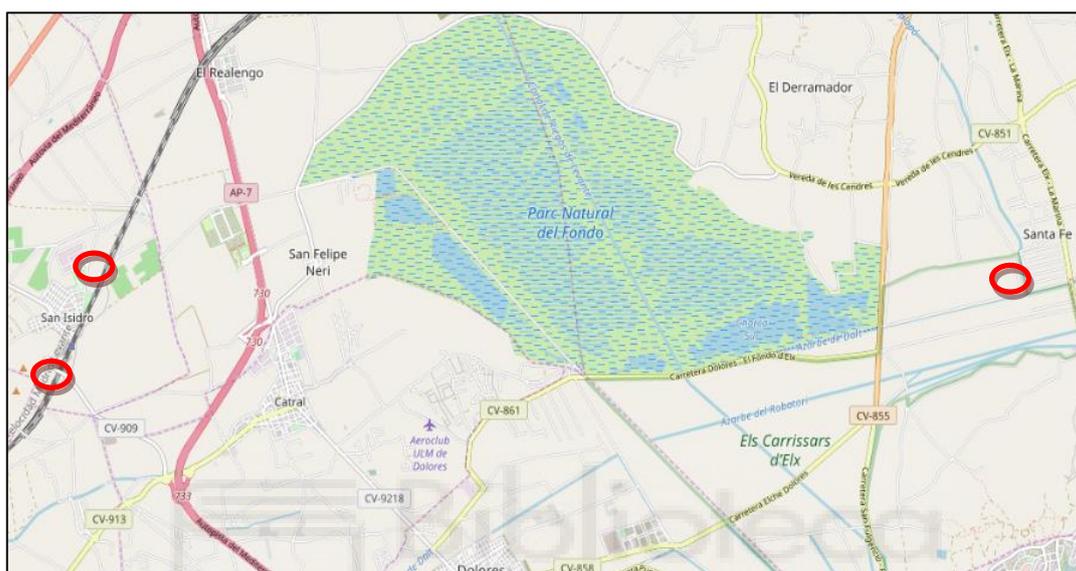
Para abordar nuestro objetivo se realizarán dos tipos de análisis de la especie. Uno filogeográfico basado en un fragmento del gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa mitocondrial. Otro filogenético, para tratar de resolver mejor las relaciones entre esta especie y el resto de especies del género *Cephalota* con los datos aportados en este trabajo.

Como trabajo previo al estudio se llevarán a cabo muestreos en localidades donde esta especie estaba citada y en zonas con existencia de hábitat potencial.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL

Los ejemplares recolectados para este estudio se recogieron realizándose varias salidas a diversas localidades (**Fig. 6**) entre mediados de mayo y principios de julio de 2018.



**Figura 6:** Localizaciones donde se han capturado ejemplares de *C. deserticoloides*: a la izquierda, en el municipio de San Isidro, se encontraron dos ejemplares en zonas relativamente cercanas entre sí (Estación de tren, abajo y Cementerio, arriba); a la derecha, en la desembocadura del río Vinalopó.

Dichas localidades se escogieron por dos motivos, en base a la constatación previa de la existencia de la especie en la zona por anteriores estudios y por la presencia de hábitat potencial. Se obtuvieron un total de nueve ejemplares (**Tabla 1**) entre las poblaciones de San Isidro y Elche (desembocadura del Río Vinalopó).

**Tabla 1:** Listado de los ejemplares de *C. deserticoloides* utilizados en este trabajo.

Código	Localización	Coordenadas	Fecha
1	San Isidro "estación"	38°09'57.3"N, 0°50'30.9"W	25/05/2018
2	San Isidro "estación"	38°09'57.3"N, 0°50'30.5"W	25/05/2018
3	San Isidro "cementerio"	38°10'48.5"N 0°49'59.9"W	25/05/2018
5	Desembocadura Vinalopó	38°10'29.4"N, 0°40'40.4"W	12/07/2018
6	Desembocadura Vinalopó	38°10'30.3"N, 0°40'40.6"W	12/07/2018
7	Desembocadura Vinalopó	38°10'29.4"N, 0°40'40.9"W	12/07/2018
8	Desembocadura Vinalopó	38°10'29.4"N, 0°40'40.5"W	12/07/2018
9	Desembocadura Vinalopó	38°10'29.4"N, 0°40'40.3"W	12/07/2018
10	Desembocadura Vinalopó	38°10'29.4"N, 0°40'40.8"W	12/07/2018

### 3.2. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

Una vez se recolectaron los ejemplares en el campo, se conservaron en etanol a – 20°C hasta que se procedió a la extracción del ADN en el laboratorio. Ésta se llevó a cabo mediante dos protocolos alternativos: el kit Spin Tissue Mini Kit (Strattec, Alemania) y el kit Phire Animal Tissue Direct PCR (Thermo Scientific, EEUU).

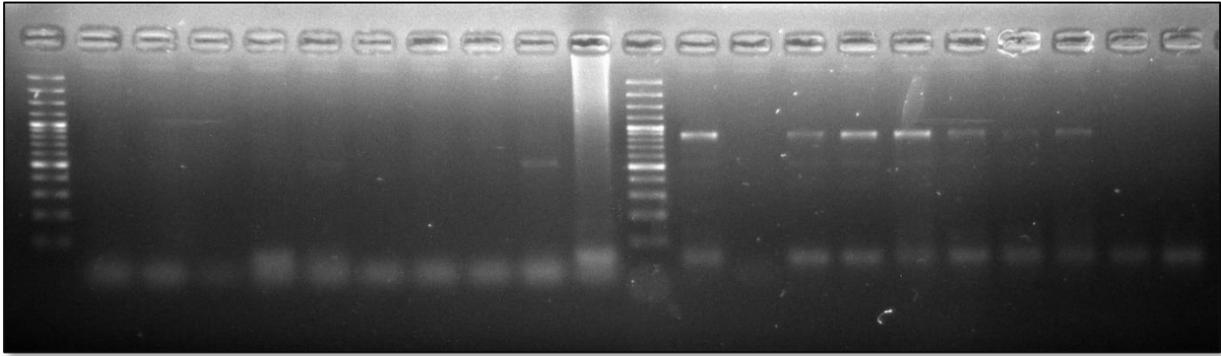
La eficiencia de las extracciones se comprobó midiendo la concentración de ADN en cada una de ellas en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, EEUU).

Se procedió a la amplificación de un fragmento del gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa mitocondrial (*cox1*) mediante PCR. Para ello se utilizaron los primers Jerry y Pat (Simon *et al.*, 1994). Las muestras extraídas mediante el kit Spin Tissue se amplificaron usando la polimerasa MyTaq RedDNA Polymerase, (Bioline, Reino Unido), mientras que las extraídas con el kit Phire se amplificaron con la polimerasa Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, EEUU).

El programa consistió en las siguientes fases:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos
- 5 ciclos:
  - Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos
  - Anillamiento a 45°C durante 30 segundos
  - Elongación a 72°C durante 1 minuto
- 5 ciclos:
  - Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos
  - Anillamiento a 47°C durante 30 segundos
  - Elongación a 72°C durante 1 minuto
- 30 ciclos:
  - Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos
  - Anillamiento a 50°C durante 30 segundos
  - Elongación a 72°C durante 1 minuto
- Elongación final a 72°C durante 10 minutos

Al término de la PCR se comprobó que la reacción había tenido lugar corriendo los productos en un gel de agarosa (**Fig.7**) al 1,5%.



**Figura 7:** Resultado de la electroforesis en gel de agarosa. El orden de los pocillos, de izquierda a derecha, es el siguiente: **1** Marcador; **2 – 10** Extracciones con el método Phire; **11** Control negativo; **12** Marcador; **13 – 21** Extracciones con el método de extracción por columnas; **22** Control negativo.

### 3.3. SECUENCIACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS

Los productos de PCR fueron secuenciados en la empresa Secugen (Madrid, España).

Una vez obtenidas las secuencias, se importaron en el programa GENEIOUS (www.geneious.com) para su edición. En primer lugar, se recortaron los extremos de poca calidad y se corrigieron a mano posibles errores de secuenciación. A continuación, se alinearon las secuencias usando el algoritmo MAFFT (Fig. 8) (Kato *et al.*, 2002).



**Figura 8:** Captura de pantalla del programa GENEIOUS donde se muestran las secuencias una vez alineadas.

### 3.4. CONSTRUCCIÓN DE LAS MATRICES

Se construyeron dos matrices: una de ellas para el análisis filogenético incluyendo nuestras secuencias más otras secuencias de *C. deserticoloides* y otras especies de *Cephalota*: *C. circumdata*, *C. elegans*, *C. littorea*, *C. zarudniana*, *C. chiloleuca*, *C. besseri*, *C. dulcinea* y *C. hispanica* (Herrera, 2018); y otra para el análisis filogeográfico incluyendo únicamente las secuencias de *C. deserticoloides*. Éstas pertenecían a individuos recolectados para otros estudios en las localidades de San Isidro, Alhama de Murcia y Rambla Salada (Herrera, 2018). Además, se añadieron tres muestras recogidas en el año 2008 (López-López y Galián, 2010) en la población de San Isidro. Se eliminaron dos secuencias del trabajo de Herrera (2018) ya que contenía posiciones en las que no se podía determinar con exactitud el nucleótido correspondiente. En la matriz filogenética se añadieron tres secuencias procedentes de la base de datos GenBank de otras especies de cicindélidos como grupos externos (*Ellipsoptera sperata*, *Eugrapha minuta* y *Cicindela campestris*), elegidas según su grado de relación filogenética con el género *Cephalota* (Gough *et al.*, 2018).

### 3.5. ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO

Para establecer las relaciones filogeográficas entre las poblaciones de *C. deserticoloides* se utilizó el programa POPART (Leigh *et al.*, 2015) y dentro de éste, se eligió la opción Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999) para calcular la red.

### 3.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para obtener el modelo más adecuado para procesar los datos, se utilizó el programa jMODELTEST (Darriba *et al.*, 2012). Una vez establecido el modelo idóneo, se pasó al cálculo del árbol con tres programas distintos: MRBAYES, IQTREE y BEAST.

- Análisis con MRBAYES (Ronquist y Huelsenbeck, 2003): Se generó una cadena de Markov Monte Carlo de 1.000.000 generaciones, muestreando los árboles cada 1.000 generaciones.
- Análisis con IQTREE (Nguyen *et al.*, 2015): Previamente al análisis, se particionó la matriz según las posiciones de los codones. Se calculó el modelo más adecuado usando la función incluida en el programa (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), y se generaron 10.000 réplicas de bootstrap ultrarrápido (Hoang *et al.*, 2017).

- Análisis con BEAST (Drummond *et al.*, 2012): Se probaron combinaciones con dos modelos de árbol (coalescente con tamaño poblacional constante y modelo de Yule) y dos modelos de reloj molecular (estricto y relajado). Los relojes se calibraron con la tasa de sustitución nucleotídica calculada por Pons *et al.* (2010) para este gen en coleópteros.



#### 4. RESULTADOS

De los dos métodos utilizados para la extracción del ADN, se descartaron los obtenidos con el kit Phire Animal Tissue Direct PCR (Thermo Scientific, EEUU), debido a que la PCR realizada con estas extracciones no logró amplificar el fragmento deseado.

Tras el editado, la longitud de las secuencias quedó en 571 pares de bases.

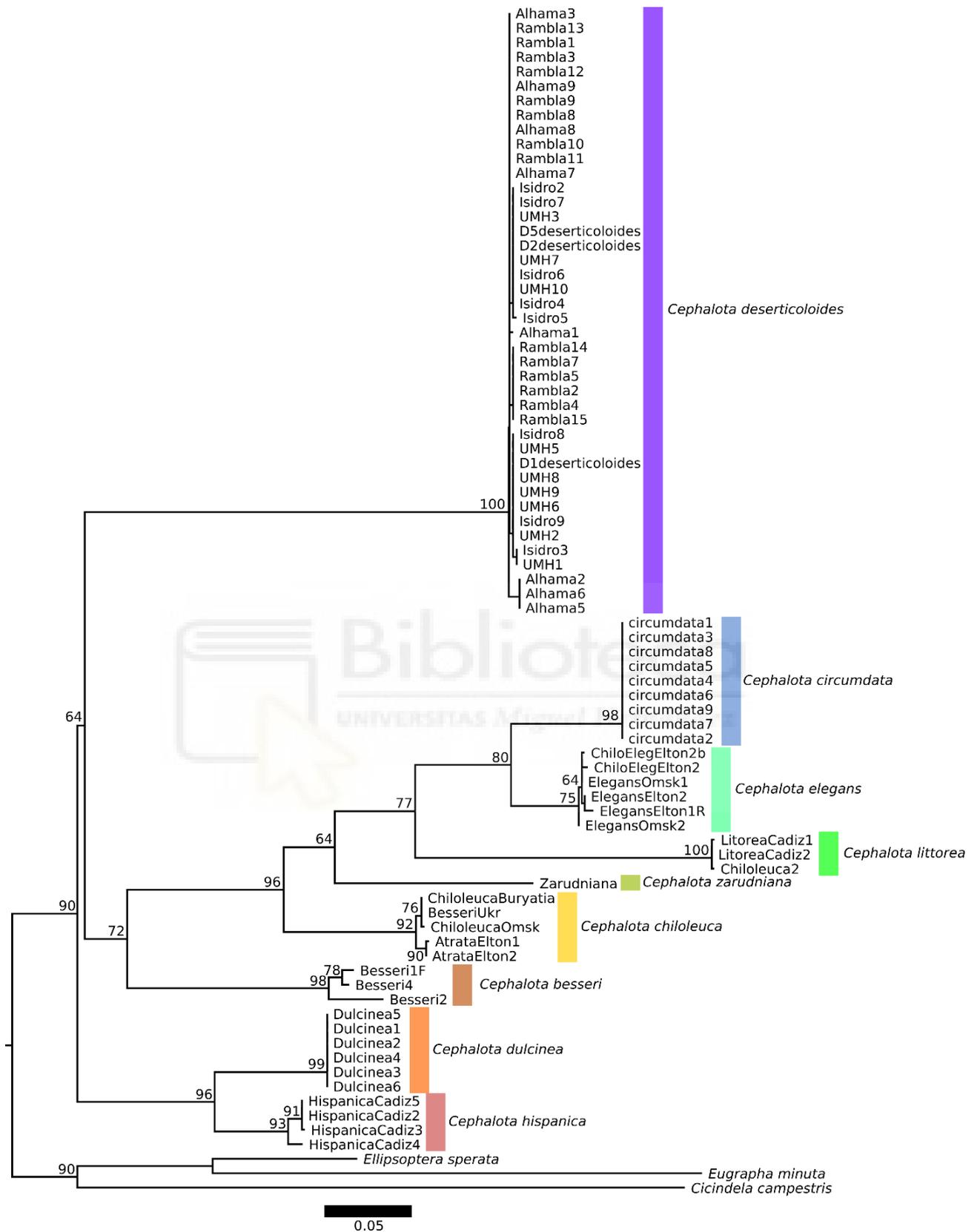
Los resultados obtenidos con los programas MRBAYES e IQTREE (**Fig. 9 y 10**) coinciden. La topología de los árboles filogenéticos es bastante similar y coincide también con la obtenida por Herrera (2018). Se obtiene, por un lado, un linaje que engloba a las especies *C. circumdata*, *C. elegans*, *C. littorea*, *C. chiloleuca* y *C. zarudniana*. Por otra parte, con bajo soporte, se obtiene a *C. deserticoloides* formando un linaje propio, a *C. besseri* formando otro linaje y un clado que engloba a las otras dos especies endémicas de la península Ibérica, *C. dulcinea* y *C. hispanica*.

La topología de ambos árboles está bien soportada. Si bien presentan un soporte ligeramente reducido en algunos nodos, el resto están soportados con valores cercanos al 100%.

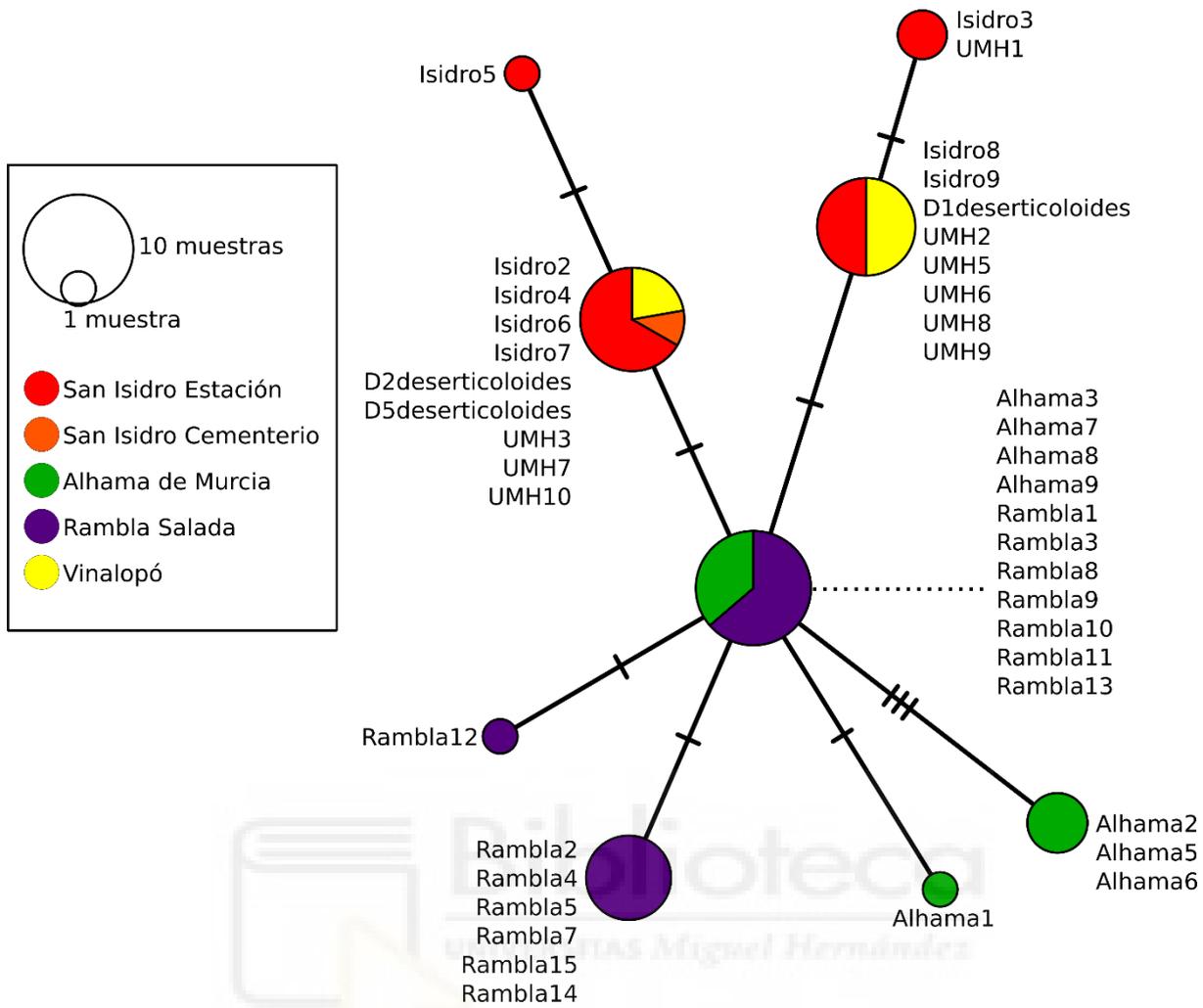
En el análisis realizado con BEAST, la mejor combinación de modelos correspondió a un reloj relajado y un modelo Yule para el árbol. Sin embargo, el árbol obtenido presentó una topología aberrante incluyendo numerosos artefactos. Los análisis realizados con modelos alternativos presentaban los mismos problemas, por lo que se decidió descartar los resultados obtenidos en este programa.

La red filogeográfica para *C. deserticoloides* presentó un patrón en forma de estrella (**Fig. 11**), similar al obtenido por Herrera (2018). Incluye un haplotipo central, presente en individuos de Rambla Salada y Alhama de Murcia, del cual derivan una serie de haplotipos con pocos pasos mutacionales. Las muestras colectadas en la localidad redescubierta del Vinalopó se agrupan junto a las de San Isidro, formando dos linajes derivados del haplotipo central.





**Figura 10:** Árbol filogenético obtenido mediante el programa IQTREE, donde se aprecia una distribución semejante al árbol de la Fig. 9, a excepción de la especie *C. chiloleuca*, que en este árbol es especie hermana del clado formado por *C. zarudniana*, *C. littorea*, *C. elegans* y *C. circumdata*. Los números en los nodos corresponden a valores de *bootstrap*.



**Figura 11:** Red filogeográfica que indica la red de los distintos haplotipos obtenidos. En la leyenda se indica a qué localización pertenece cada color y la relación del tamaño de cada haplotipo

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Cephalota deserticoloides*

El grado de distancia genética de *C. deserticoloides* respecto a sus parientes más cercanos abarca de 6,6% a 9,6% según el trabajo de Diogo *et al.* (1999), basado en los fragmentos 16S, *nad1*, *cox3* y *cob*. Este valor es relativamente alto y, junto con su singularidad filogenética, hacen que esta especie sea un endemismo bastante valioso.

En este trabajo, basado en el fragmento *cox1*, no se han encontrado haplotipos nuevos, incluso habiendo muestreado una localidad hasta ahora no visitada (desembocadura del río Vinalopó) y volviendo a muestrear una conocida (San Isidro). Esto puede significar que se tiene un conocimiento bastante completo de la diversidad genética de esta especie, con lo que puede resultar improbable encontrar haplotipos adicionales a los ya conocidos.

El mayor valor de distancia genética observado entre las muestras de *C. deserticoloides* analizadas en este trabajo es de un 0,8% entre individuos de las poblaciones de Alhama y San Isidro. Este valor corresponde al valor medio de distancia genética encontrada para este fragmento de ADN mitocondrial en otras especies de cicindélidos, en las cuales pueden observarse distancias de hasta el 2,5% (López-López *et al.*, 2015).

Este dato indica que la diversidad genética de *C. deserticoloides* es realmente baja, con lo que existe un riesgo para el futuro de la especie debido a que cuanto menor es la diversidad, menor es la facilidad para la adaptación a condiciones adversas o cambiantes del medio.

### 5.2. HISTORIA EVOLUTIVA DE *Cephalota deserticoloides*

La red filogeográfica obtenida permite sugerir diversas hipótesis acerca de la historia poblacional de la especie. En ella, se muestra un patrón en forma de estrella, con lo que se puede asumir que los haplotipos que rodean al central han derivado de él. Como están separados por pocos pasos mutacionales, la separación debió tener lugar hace poco tiempo, ya que de lo contrario habría más mutaciones y los haplotipos se encontrarían más alejados.

Por ello, una hipótesis posible plantearía la presencia de una población ancestral genéticamente diversa, con muchos haplotipos. De repente, y por algún cambio en las condiciones ambientales, el medio pudo volverse hostil para la especie, con lo que los individuos empezaron a morir o a no poder reproducirse, y poco a poco se fueron perdiendo haplotipos. En este punto, pudo suceder que la reducción de la población fuera tal, que únicamente quedara un haplotipo compartido por pocos individuos. Posteriormente, las condiciones ambientales volverían a cambiar favorablemente para esta especie, con lo que el número de ejemplares que comparten este único haplotipo empezaría a crecer. Progresivamente, con el paso de las generaciones, empezarían a aparecer individuos en los que hubiera alguna mutación.

De esta manera, vuelven a aparecer nuevos haplotipos que dotan de algo de diversidad a la especie, que en la red filogeográfica se distribuyen rodeando al haplotipo del que derivan, si bien aún está lejos del nivel de complejidad genética de sus antepasados.

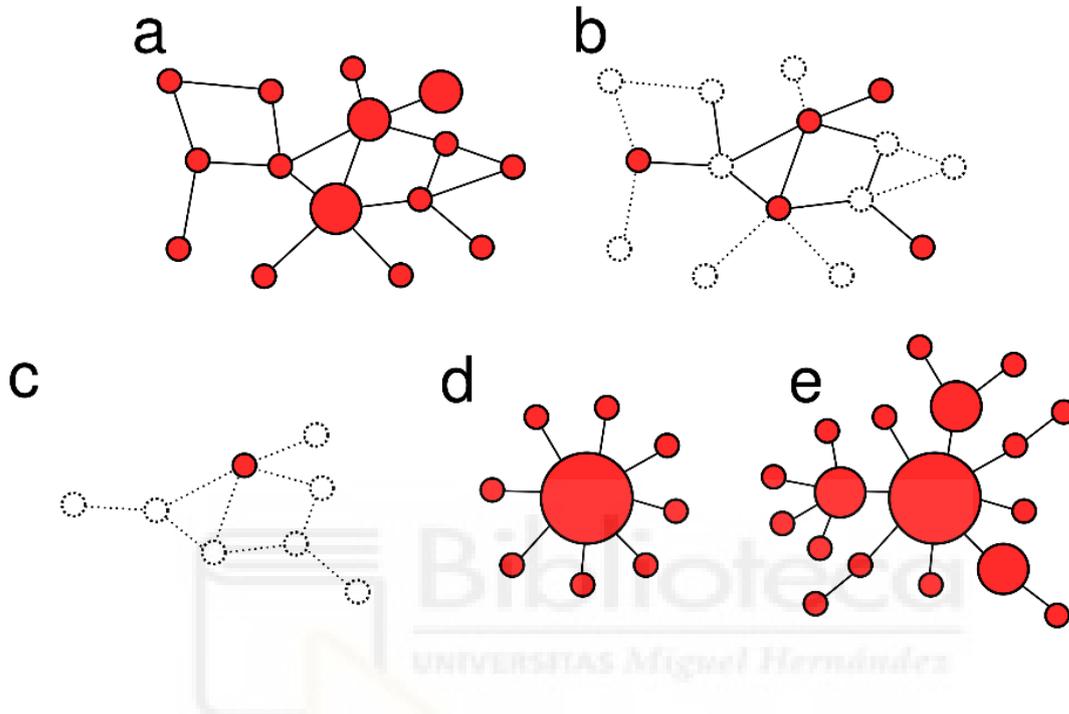
Así, con el paso de las generaciones volvieron a aparecer mutaciones, tanto en el haplotipo central como en los haplotipos generados a partir de él, con lo que la diversidad genética de la especie creció y por ello el número de haplotipos. Los ejemplares con distinto haplotipo se reprodujeron y su número aumentó resultando en la red filogeográfica obtenida en el trabajo.

Sin embargo, se puede plantear una hipótesis alternativa.

Si se observa la red con atención, se aprecia cómo cuatro de los haplotipos tienen un tamaño relativamente grande. Eso puede querer decir que estos haplotipos ya existían antes del cuello de botella y sobrevivieron a él. Por ello, se puede inferir el siguiente proceso:

Partiríamos de una población ancestral de *C. deserticoloides* con un patrón en forma de estrella, derivado de un cuello de botella anterior. En ese patrón estaban presentes el haplotipo central, y al menos otros tres haplotipos de mayor tamaño, formando un polimorfismo ancestral. Además, en dicha población podría haber otros haplotipos que se han perdido.

En este punto, hubo otro cuello de botella y únicamente sobrevivieron los cuatro haplotipos comentados. Cuando se reestablecieron las condiciones adecuadas para la especie, se empezó a generar más diversidad a partir de estos haplotipos, obteniéndose la red observada en este trabajo.



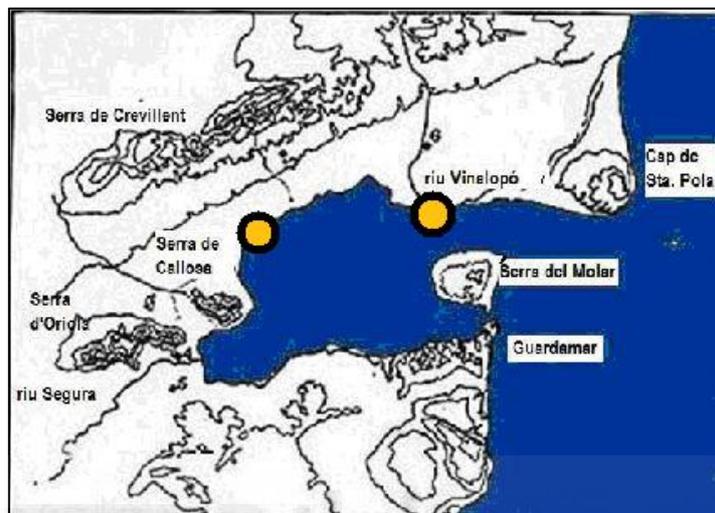
**Figura 12:** Evolución de la red haplotípica de una especie hipotética a lo largo de una historia similar a la observada en *C. deserticoloides*. **a)** Se observa una población inicial genéticamente diversa, con diversos haplotipos. **b)** Por un cambio en las condiciones ambientales, la población se ve drásticamente reducida, extinguiéndose varios haplotipos y reduciéndose el número de individuos que comparten los haplotipos supervivientes. **c)** La reducción lleva a que finalmente quede un único haplotipo. **d)** Cuando las condiciones vuelven a ser favorables para la especie, aumenta el número de individuos que comparten el haplotipo superviviente, y surgen mutaciones con el paso de las generaciones, creándose un patrón en forma de estrella. **e)** Estas mutaciones van generando diversidad, y con el tiempo la red de haplotipos se vuelve más compleja.

### 5.3. RELACIONES DE LA POBLACIÓN DEL VINALOPÓ CON OTRAS POBLACIONES

Observando cualquier mapa, se puede observar que la población de San Isidro y la desembocadura del Vinalopó están separadas actualmente por terreno hostil para la especie, sin ningún tipo de conexión posible. Sin embargo, la red filogeográfica muestra a los individuos de ambas localidades formando una única población sin separación genética.

Para entender esto, es necesario tener en cuenta un factor histórico. La zona en la que se sitúan estas localidades ha cambiado mucho durante estos últimos dos siglos. Hasta finales del siglo XIX, existía la denominada albufera de Elche. Ésta fue drenada por orden del

Cardenal Belluga, tanto para obtener nuevas tierras de cultivo, como por considerar los humedales como fuente de enfermedades y epidemias (Santjaume y González, 1978). Realmente, ambas poblaciones estaban conectadas cuando existía dicha albufera, a través de una franja de saladar costero, y como no ha pasado suficiente tiempo para que se genere diversidad genética, se siguen viendo como una única población en la red filogeográfica.



**Figura 13:** Antigua albufera de Elche. A través de la banda de saladar que circundaba la albufera, las poblaciones de San Isidro y del Vinalopó (círculos amarillos) estaban conectadas. (<http://www.campdelx.es/page/7/>).

#### 5.4. FILOGENIA DE *Cephalota deserticoloides*

Se esperaba que la incorporación de las secuencias obtenidas en este trabajo a la filogenia del género *Cephalota* ayudara a clarificar la relación de *C. deserticoloides* con el resto de especies del género. Los resultados de los análisis filogenéticos corroboran los resultados obtenidos por Herrera (2018). Esto se puede comprobar observando las figuras 9 y 10: el linaje formado por *C. deserticoloides* ocupa una posición basal, lo que indica la divergencia temprana de este taxón con respecto al resto de especies de *Cephalota*.

Para avanzar realmente en este aspecto habría que incluir más especies y secuenciar otros fragmentos, tanto de *C. deserticoloides* como del resto de especies del género *Cephalota*. Así, se dispondría de más datos para mejorar la resolución del árbol filogenético y conocer mejor cómo están emparentadas las especies.

## 5.5. IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA CONSERVACIÓN DE LA ESPECIE

Los resultados han desvelado que la población redescubierta en este trabajo, localizada en la estepa hipersalina de la desembocadura del río Vinalopó, presenta los mismos haplotipos que la población de San Isidro. Este dato respalda el hecho de que ambas poblaciones estuvieron antiguamente conectadas en el ámbito costero de la Albufera de Elche, previo drenaje de la misma. Con la desaparición de dicha albufera se produjo una drástica reducción del hábitat potencial para la especie, además de una grave fragmentación de éste, que queda reducido a parches puntuales.

En lo que respecta a la población de San Isidro, el análisis filogeográfico revela una mayor diversidad de haplotipos en los ejemplares recolectados en esa zona (**Fig. 11**). Por ello es preocupante que en los últimos años hayan sucedido una serie de hechos que han acelerado el proceso de antropización del medio. El saladar de esta población fue arrasado en una extensión de aproximadamente 10 hectáreas para la realización de una infraestructura ferroviaria, entre las que se encuentra un puente. Posteriormente, dicho puente fue demolido por el trazado del tren de alta velocidad a su paso por San Isidro, lo que implicó una actuación sobre el medio totalmente innecesaria, además de la destrucción de más terreno de saladar por el acopio de materiales asociado a las obras ([www.diarioinformacion.com/vega-baja/2009/09/24/escarabajo-sienta-tres-empresas-banquillo/934098.html](http://www.diarioinformacion.com/vega-baja/2009/09/24/escarabajo-sienta-tres-empresas-banquillo/934098.html)).

Por estos hechos, la asociación AHSA interpuso una denuncia por la destrucción de parte del saladar donde estaba presente *C. deserticoloides*, aunque acabó prescribiendo debido al aplazamiento de las vistas (AHSA, 2015).

Sin embargo, actualmente todavía quedan parches de saladar en relativo buen estado de conservación, lo que invita a la reflexión sobre la necesidad de elaborar un buen plan de conservación que establezca una gestión de la especie y que exija responsabilidades en caso de alteración o destrucción de su hábitat.

## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este trabajo se ha realizado la caracterización taxonómica, mediante técnicas moleculares, de varios ejemplares de *C. deserticoloides* presentes en diversas localidades de la provincia de Alicante. Además, se ha incluido en el estudio otras especies del género *Cephalota*. Mediante la realización de dos árboles filogenéticos, se ha reafirmado la separación basal de esta especie con respecto al resto de especies de su género, lo que reafirma la importancia de elaborar un plan de conservación para este endemismo amenazado.

Además, el análisis de una red haplotípica, elaborada también en este trabajo, plantea la existencia de un cuello de botella en la historia de la especie en el que se pasó de tener una gran variedad de haplotipos a unos pocos o uno único, a partir de donde surgieron los demás. Con ello, no se han encontrado haplotipos nuevos a los que ya estaban registrados, si bien la sorpresa fue el redescubrimiento de la población en la desembocadura del río Vinalopó. Esta población mostró un haplotipo que estaba presente en San Isidro, lo que induce a pensar en la conexión de ambas poblaciones.

Como el hábitat está muy fragmentado y reducido, es complicado que se hubieran producido migraciones a otros parches, por lo que la respuesta podría encontrarse en la antigua Albufera de Elche. Por ello, sería esperable que realizándose muestreos en zonas donde exista hábitat potencial, dentro del ámbito de la antigua zona de costa de la Albufera de Elche (**Fig. 13**), se encontraran más poblaciones relictas, cuya caracterización es un paso previo para proponer medidas de conservación eficaces.

El conocimiento sobre *Cephalota deserticoloides* podría aumentar con la realización de nuevos estudios, tanto con nuevos muestreos de más ejemplares en zonas donde ya se ha constatado la presencia de la especie, como nuevos puntos de muestreo donde exista hábitat potencial. Con ello, aumentaría la cantidad de datos que se tendría sobre la especie y se avanzaría en el conocimiento de su dinámica poblacional, lo que provocaría que se adoptara una mayor conciencia sobre la importancia de conservar un endemismo de nuestra zona, que se encuentra actualmente amenazado por la creciente antropización del medio.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO-ZARAZAGA, M. A. (2015). Orden Coleoptera. *Revista IDE@-SEA*, 55, 1-18.
- AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., ... & SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489-522.
- AVISE, J. C. (1989). A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(9), 279-281.
- AVISE, J. C. (1996). Toward a regional conservation genetics perspective: phylogeography of faunas in the southeastern United States. *Conservation Genetics*, 431-470.
- AVISE, J. C. (2000). *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P., & RÖHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- BASELGA, A., FUJISAWA, T., CRAMPTON-PLATT, A., BERGSTEN, J., FOSTER, P. G., MONAGHAN, M. T., & VOGLER, A. P. (2013). Whole-community DNA barcoding reveals a spatio-temporal continuum of biodiversity at species and genetic levels. *Nature Communications*, 4, 1892.
- BERNATCHEZ, L., & DODSON, J. J. (1990). Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) as revealed by mitochondrial-DNA restriction analysis. *Evolution*, 44(5), 1263-1271.
- BROWN, T. (2008). *Genomas/Genome*. Ed. Médica Panamericana.
- CASSOLA, F., & PEARSON, D. L. (2000). Global patterns of tiger beetle species richness (Coleoptera: Cicindelidae): their use in conservation planning. *Biological Conservation*, 95(2), 197-208.
- CHAPMAN, A. D. (2009). *Numbers of living species in Australia and the world*. Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts (Government of Australia).
- CODINA, A. (1931). Una *Cicindela* (Col.) nueva de España. *Boletín de la Sociedad Española de Entomología*, 14, 161-64.
- D.T. HOANG, O. CHERNOMOR, A. VON HAESELER, B.Q. MINH, AND L.S. VINH (2017) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518-522.
- DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., & POSADA, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.

- DIOGO, A. C., VOGLER, A. P., GIMÉNEZ, A., GALLEGO, D., & GALIÁN, J. (1999). Conservation genetics of *Cicindela deserticoloides*, an endangered tiger beetle endemic to southeastern Spain. *Journal of Insect Conservation*, 3(2), 117-123.
- DRUMMOND, A. J., SUCHARD, M. A., XIE, D., & RAMBAUT, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969-1973.
- GALTIER, N., NABHOLZ, B., GLÉMIN, S., & HURST, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541-4550.
- GEHRING, P. S., PABIJAN, M., RANDRIANIRINA, J. E., GLAW, F., & VENCES, M. (2012). The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(3), 618-632.
- GOUGH, H.M., DURAN, D.P., KAWAHARA, A.Y. AND TOUSSAINT, E.F., (2018). A comprehensive molecular phylogeny of tiger beetles (Coleoptera, Carabidae, Cicindelinae). *Systematic Entomology*. DOI: 10.1111/syen.1234
- Herrera, J. (2018) Ecología y conservación de *Cephalota (Taenidia) deserticoloides* (Codina, 1931) (Coleoptera, Cicindelidae) / Ecology and conservation of *Cephalota (Taenidia) deserticoloides* (Codina, 1931) (Coleoptera, Cicindelidae) (Tesis doctoral).
- HEWITT, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359(1442), 183-195.
- HEY J. (1997). Mitochondrial and nuclear genes present conflicting portraits of human origins. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 166-172.
- HIEKE, F. (1983). Die historische entwicklung der Käfer (Coleoptera). *Entomologische Nachrichten und Berichte*, 27(3), 105-115.
- JIMÉNEZ, P., & COLLADA, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Forest Systems*, 9(4), 237-248.
- KALYAANAMOORTHY, S., MINH, B. Q., WONG, T. K. F., VON HAESELER, A., & JERMIIN, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14, 587-589.
- KAMOUN, S., & HOGENHOUT, S. A. (1996). Flightlessness and rapid terrestrial locomotion in tiger beetles of the *Cicindela* L. subgenus *Rivacindela* van Nidek from saline habitats of Australia (Coleoptera: Cicindelidae). *The Coleopterists' Bulletin*, 50(3), 221-230.
- KATOH, K., MISAWA, K., KUMA, K. I., & MIYATA, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066.

- KLUG, W. S. & CUMMINGS, M. R. (2006). *Concepts of Genetics*. Pearson Education.
- KLUG, W. S., & CUMMINGS, M. R. (2013). *Conceptos de genética*. Pearson Educación.
- LANTERI, A. A., & CONFALONIERI, V. A. (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Morrono, J. J. & Bousquets, J. L. (eds.) *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- LEIGH, J. W., & BRYANT, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- LÓPEZ, M. A., DE LA ROSA, J. J., & BAENA, M. (2006). Descripción de *Cephalota (Taenidia) dulcinea* sp. n. de la Península Ibérica (Coleoptera, Cicindelidae). *Boletín de la SEA*, (39), 165-170.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A., ABDUL AZIZ, A., & GALIÁN, J. (2015). Molecular phylogeny and divergence time estimation of *Cosmodela* (Coleoptera: Carabidae: Cicindelinae) tiger beetle species from Southeast Asia. *Zoologica Scripta*, 44(4), 437-445.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A., HUDSON, P., & GALIÁN, J. (2016). Islands in the desert: Species delimitation and evolutionary history of *Pseudotetracha* tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae: Megacephalini) from Australian salt lakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101, 279-285.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A., & VOGLER, A. P. (2017). The mitogenome phylogeny of Adephaga (Coleoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 114, 166-174.
- LORENZ, W. (2005). *Nomina Carabidarum: a directory of the scientific names of ground beetles: Insecta, Coleoptera "Geadephaga": Trachypachidae and Carabidae incl. Paussinae, Cicindelinae, Rhysodinae*. Lorenz Educational Pub.
- MORITZ, C. (1995). Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 349(1327), 113-118.
- NGUYEN L.-T., H.A. SCHMIDT, A. VON HAESELER, AND B.Q. MINH (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 268-274.
- PASSARGE, E. (2007). *Genética Texto y atlas*. Editorial Médica Panamericana.
- PEARSON, D. L., & CASSOLA, F. (1992). World-wide species richness patterns of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): indicator taxon for biodiversity and conservation studies. *Conservation Biology*, 6(3), 376-391.

- PEARSON, D. L., & CASSOLA, F. (2005). A quantitative analysis of species descriptions of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae), from 1758 to 2004, and notes about related developments in biodiversity studies. *The Coleopterists Bulletin*, 59(2), 184-193.
- PEARSON, D. L., & VOGLER, A. P. (2001). *Tiger beetles: the evolution, ecology, and diversity of the cicindelids*. Cornell University Press.
- PEARSON, D. L., BLUM, M. S., JONES, T. H., FALES, H. M., GONDA, E., & WHITE, B. R. (1988). Historical perspective and the interpretation of ecological patterns: defensive compounds of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). *The American Naturalist*, 132(3), 404-416.
- PIERCE, B. A. (2014). *Genética: Un enfoque conceptual*. Editorial Médica Panamericana.
- PONS, J., RIBERA, I., BERTRANPETIT, J., & BALKE, M. (2010). Nucleotide substitution rates for the full set of mitochondrial protein-coding genes in Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and evolution*, 56(2), 796-807.
- RIVALIER, E. (1950). Démembrement du genre *Cicindela* Linné (Travail préliminaire limité à la fauna paléarctique). *Revue Française d'Entomologie*, 17, 217-244.
- RODERICK, G. K., & GILLESPIE, R. G. (1998). Speciation and phylogeography of Hawaiian terrestrial arthropods. *Molecular Ecology*, 7(4), 519-531.
- RODRÍGUEZ-TARDUCHY, G. (2007). *¿Hablamos de gen... o... mas?*. Editorial Hélice.
- RONQUIST, F., & HUELSENBECK, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- S. KALYAANAMOORTHY, B.Q. MINH, T.K.F. WONG, A. VON HAESLER, AND L.S. JERMIIN (2017) ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates, *Nature Methods*, 14, 587–589.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. AND ERLICH, H. A., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- SANJAUME, E. & GONZÁLVEZ, V. (1978). L'Albufera d'Elx y su litoral. *Cuadernos de Geografía de la Universidad de Valencia*, 23, 83-106.
- SCATAGLINI, M. A., CONFALONIERI, V. A., & LANTERI, A. A. (2000). Dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: evidence of RAPD analysis. *Genetica*, 108(2), 127-136.
- SERRANO, J. (2013). *Nuevo catálogo de la familia Carabidae de la península ibérica (Coleoptera)*. Editum.

- SERRANO, J., LENCINA, J. L., & ANDÚJAR, A. (2003). Distribution patterns of Iberian Carabidae (Insecta, Coleoptera). *Graellsia*, 59(2-3), 129-153.
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H., & FLOOK, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- STRACHAN, T., & READ, A. (2016). *Genética molecular humana*. Artmed Editora.
- VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., CASTAÑEDA-RICO, S., GARRIDO-GARDUÑO, T., & GUTIÉRREZ-GARCÍA, T. A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82(2), 277-297.
- VERDÚ, J. R., NUMA, C., & GALANTE, E. (2011). Atlas y libro rojo de los invertebrados amenazados de España (especies vulnerables). *Dirección General de Medio Natural y Política Forestal, Ministerio de Medio Ambiente, Medio rural y Marino*.
- VIVES, J. VIVES, E. (1978). Carábidos nuevos o interesantes para la Península Ibérica. *Miscelánea Zoológica*, 4(2): 165-176.
- WIESNER, J., (1992). Verzeichnis der Sandlaufkäfer der Welt, Checklist of the Tiger Beetles of the World, 27. Beitrag zur Kenntnis der Cicindelidae. Verlag Erna Bauer, Keltern.
- ZHANG, S. Q., CHE, L. H., LI, Y., PANG, H., ŚLIPIŃSKI, A., & ZHANG, P. (2018). Evolutionary history of Coleoptera revealed by extensive sampling of genes and species. *Nature Communications*, 9(1), 205.