

**ANÁLISIS GENÉTICO DE JUVENILES DE
LAMPROPELTIS GETULA CALIFORNIAE
CAPTURADOS EN 2014-2015**



Agosto de 2015

**PROYECTO LIFE LAMPROPELTIS NAT/ES/000565
CONTROL DE LA ESPECIE EXÓTICA INVASORA *LAMPROPELTIS*
GETULA CALIFORNIAE EN LA ISLA DE GRAN CANARIA**



ANÁLISIS GENÉTICO DE JUVENILES DE *LAMPROPELTIS GETULA CALIFORNIAE* CAPTURADOS EN 2014-2015

DRA. CATALINA MONZÓN-ARGÜELLO

**PROYECTO LIFE LAMPROPELTIS NAT/ES/000565
CONTROL DE LA ESPECIE EXÓTICA INVASORA *LAMPROPELTIS*
GETULA CALIFORNIAE EN LA ISLA DE GRAN CANARIA**



Agosto de 2015



Índice

1. Introducción.....	2
2. Protocolo de toma de muestras y análisis genéticos.....	3
3. Resultados	9
4. Conclusiones y recomendaciones.....	18
5. Referencias	21
6. Anexo I.....	23

1. Introducción

Las especies invasoras pueden originar cambios dramáticos en la biodiversidad nativa, tanto a nivel de la comunidad como del ecosistema, y representan una de las principales amenazas de la biodiversidad global (Gurevitch y Padilla 2004; Carroll 2007). El éxito de una invasión depende de diversos factores entre los que se incluyen la presión de propágulo (el número de individuos que se dispersan y el número de eventos de liberación), la capacidad invasora de la especie y la invasibilidad de la comunidad receptora (susceptibilidad al establecimiento y expansión de la especie invasora; Lockwood et al. 2005). La variabilidad genética de la nueva población puede ser un factor determinante de la capacidad invasora, ya que debido al bajo número de individuos fundadores, la diversidad genética de la población invasora es reducida. Por otro lado, las liberaciones secundarias, que con frecuencia difieren de la introducción original en tiempo y origen, pueden ser cruciales a la hora de promover la naturalización y expansión poblacional (Kowarik 2003).

Durante el proyecto *LIFE Lampropeltis: Control de la especie exótica invasora Lampropeltis getula californiae en la isla de Gran Canaria*, se han capturado centenares de ejemplares de culebra real de California (*Lampropeltis getula californiae*). El objetivo de este estudio es evaluar si estas capturas han generado cambios en la variabilidad, diferenciación genética y en el tamaño efectivo (N_e) de las poblaciones de Telde y Gáldar. Para ello, se analizaron 13 marcadores microsatélites específicos para la especie en ejemplares de reducido tamaño, intentando representar de este modo a las generaciones más recientes de ambas poblaciones. Los resultados se compararon con los obtenidos en la Acción A.4 del citado proyecto, que analizó individuos de tallas grandes capturados durante los años 2009-2011 (ejemplares de 10 años de edad media; Patiño 2012) en las dos poblaciones. La comparación de los resultados de ambos análisis ha permitido determinar los cambios genéticos ocurridos en aproximadamente 14 años y que corresponderían al paso de 3 generaciones, ya que los individuos alcanzan la madurez sexual a la edad de 3-4 años (Patiño 2012).

2. Protocolo de toma de muestras y análisis genético

2.1 Toma de muestras

Debido a la escasez de capturas de juveniles en la localidad de Gáldar, la muestra se limitó a los 15 ejemplares más pequeños capturados entre marzo de 2014 y mayo de 2015, y que presentaron una longitud total media de 60,3 cm (DT = 8,5 cm; Tabla 1). En Telde, los juveniles fueron mucho más frecuentes, por lo que se pudieron muestrear 45 entre febrero de 2014 y junio de 2015, que presentaron una longitud total media de 45,9 cm (DT = 7,0 cm; Tabla 1). Ambos grupos de muestras se denominan "juveniles" de Gáldar y Telde, respectivamente, a lo largo de este informe. Se considera que estos tamaños muestrales (Gáldar $n = 15$; Telde $n = 45$) son representativos de las poblaciones, ya que el número de serpientes presentes en la localidad de Telde es bastante superior al de Gáldar.

En el análisis genético anterior (Acción A.4 del proyecto *LIFE Lampropeltis*), la longitud total media de los ejemplares de Gáldar analizados fue de 124,9 cm (DT = 16,4 cm) mientras que para los individuos de Telde, la longitud total media fue de 100,6 cm (DT = 14,6 cm). Ambos grupos de muestras se denominan "adultos" de Gáldar y Telde, respectivamente, a lo largo de este informe.

Tabla 1. Juveniles de culebra real de California capturados en los núcleos de Gáldar y Telde y analizados con 13 marcadores microsatélites. Se muestra la fecha de contacto para la recogida del ejemplar, el sexo, la longitud total (Long.; cm) y el peso (g). Vals., Valsequillo.

Individuo	Municipio	Fecha contacto	Sexo	Long. (cm)	Peso (g)
1-20141113-2-615	Gáldar	13/11/2014	Hembra	50	36
1-20140326-2-84	Gáldar	26/03/2014	Hembra	51	29
1-20150312-2-19	Gáldar	12/03/2015	Macho	51	48
1-20150420-2-55	Gáldar	20/04/2015	Hembra	52	42
1-20150514-2-211	Gáldar	14/05/2015	Macho	54	79
1-20150427-2-85	Gáldar	27/04/2015	Hembra	57	39
1-20150427-2-81	Gáldar	27/04/2015	Macho	57	55
1-20140318-2-70	Gáldar	18/03/2014	Hembra	58	40
1-20140912-2-538	Gáldar	12/09/2014	Hembra	60	51
1-20140813-2-498	Gáldar	13/08/2014	Hembra	63	60
1-20140606-2-302	Gáldar	06/06/2014	Hembra	65	80
3-20150428-2-88	Gáldar	27/04/2015	Macho	67	73
1-20140407-2-112	Gáldar	07/04/2014	Macho	68	58
1-20140722-2-457	Gáldar	22/07/2014	Hembra	75	117
1-20140415-2-128	Gáldar	15/04/2014	Macho	76	106

Continuación Tabla 1

3-20140922-1-1436	Telde	20/09/2014	Hembra	31	11
3-20140905-1-1418	Telde	04/09/2014	Hembra	33	13
3-20141030-1-1460	Telde	29/10/2014	Hembra	33	11
1-20150128-1-10	Telde	28/01/2015	Macho	33	13
3-20140901-1-1403	Telde	29/08/2014	Hembra	34	16
3-20140930-1-1446	Telde	29/09/2014	Hembra	34	16
3-20140930-1-1447	Telde	29/09/2014	Hembra	35	12
3-20150427-1-127	Telde	26/04/2015	Hembra	36	23
3-20140922-1-1435	Telde	20/09/2014	Hembra	37	16
3-20141125-1-1468	Telde	24/11/2014	Hembra	39	32
1-20141127-1-1469	Telde	27/11/2014	Macho	40	21
1-20141204-1-1473	Telde	04/12/2014	Hembra	40	25
3-20150505-2-114	Telde	05/05/2015	Hembra	41	16
3-20150425-2-77	Telde (Vals.)	25/04/2015	Macho	41	23
3-20150514-2-218	Telde	14/05/2015	Macho	43	24
1-20141127-1-1470	Telde	27/11/2014	Macho	45	26
1-20150408-1-71	Telde	08/04/2015	Hembra	45	31
1-20150428-1-133	Telde	28/04/2015	Macho	45	33
1-20140402-1-916	Telde	02/04/2014	Macho	46	20
1-20150406-1-59	Telde	06/04/2015	Hembra	47	34
3-20150601-1-244	Telde	29/05/2015	Macho	47	28
1-20150520-1-177	Telde	20/05/2015		48	33
1-20140305-1-869	Telde	05/03/2014	Hembra	48	23
1-20140310-1-883	Telde	10/03/2014	Hembra	48	30
1-20140403-1-922	Telde	03/04/2014	Hembra	48	20
3-20150429-1-141	Telde	28/04/2015	Hembra	49	53
3-20150418-1-97	Telde	17/04/2015	Hembra	50	40
3-20150518-2-245	Telde	17/05/2015	Macho	50	30
3-20150511-2-181	Telde	08/05/2015	Macho	50	43
1-20150608-1-285	Telde	08/06/2015	Macho	50	35
3-20150512-2-195	Telde	11/05/2015	Hembra	50	34
3-20140507-1-1018	Telde	07/05/2014	Hembra	50	31
1-20140410-1-937	Telde	10/04/2014	Macho	50	26
1-20150525-1-195	Telde	25/05/2015	Hembra	50	40
3-20140524-1-1102	Telde	22/05/2014	Macho	51	38
3-20140524-1-1103	Telde	22/05/2014	Macho	51	37
1-20140602-1-1139	Telde	02/06/2014	Macho	51	41
3-20140211-1-858	Telde	11/02/2014	Hembra	51	41
3-20150527-1-212	Telde	27/05/2015	Macho	52	32
1-20140212-1-859	Telde	12/02/2014	Macho	52	28
3-20150609-1-287	Telde	09/06/2015	Hembra	53	51
1-20150602-1-253	Telde	02/06/2015	Macho	53	52
1-20150502-1-163	Telde	02/05/2015	Hembra	53	38
1-20140422-1-970	Telde	22/04/2014	Hembra	53	39
1-20150428-1-134	Telde	28/04/2015	Hembra	54	51
1-20140423-1-976	Telde	23/04/2014	Hembra	54	36
1-20140327-1-910	Telde	27/03/2014	Macho	54	45
3-20150530-1-230	Telde	30/05/2015	Macho	55	65

2.2 ANÁLISIS DE LABORATORIO

El proceso de extracción, amplificación del DNA y genotipado se realizó en el laboratorio BIOMOL de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Para el análisis genético se tomó una biopsia de tejido de las colas de los ejemplares. El DNA genómico de las muestras fue extraído utilizando el kit comercial EZNA Tissue kit (Omega Bio-Tek ®). Se digirieron alrededor de 25 mg de cada muestra con *proteínasa K* a 55-56 °C durante 24 h. A continuación, y siguiendo el protocolo del proveedor, se realizaron una serie de lavados para conseguir la purificación del DNA que quedó retenido en una columna. Finalmente, el DNA aislado se disolvió en 200 µL de tampón de elución.

Se amplificaron 13 microsatélites tri- y tetranucleótidos diseñados para la especie (Tabla 2; Monzón-Argüello et al. en prensa) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Las PCR se realizaron en dos reacciones multiplex de 7 y 6 marcadores y 14 y 11 µL, respectivamente (Tabla 2). Se utilizó el kit Platinum® Multiplex PCR Master Mix (Applied Biosystems), que permite la amplificación simultánea de varios *loci*, añadiendo en cada reacción 3 µL del DNA extraído (~60 ng). La concentración de los cebadores fue de 1 µM para los *loci* *L. getula* 6, *L. getula* 3, *L. getula* 23 y *L. getula* 14, de 2 µM para los *loci* *L. getula* 16, *L. getula* 26, *L. getula* 2, *L. getula* 5, *L. getula* 21, *L. getula* 25 y *L. getula* 9 y de 3 µM para los *loci* *L. getula* 15 y *L. getula* 1. Las condiciones utilizadas para las dos reacciones de PCR fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min seguido de 8 ciclos de 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. A continuación, 22 ciclos adicionales de PCR como los descritos anteriormente, pero con una temperatura de alineamiento de 56 °C seguido de una extensión final a 72 °C durante 7 min.

Los productos de PCR se diluyeron en agua a 1:20 y fueron analizados en un secuenciador ABI3700 Genetic Analyser (Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos se determinó usando el estándar GeneScan 500-LIZ y el programa STRand 2.2.30 (Toonen y Hughes, 2001).

2.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se utilizó el programa Micro-Checker 2.2.3 para detectar errores de genotipado (Van Oosterhout et al. 2004). Se evaluó la existencia de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weingberg (HW) para cada localidad y cada *locus* utilizando el programa Genepop 3.4 (Rousset 2008). La ley de

Hardy-Weinberg establece que en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos son aleatorios y no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio que en *loci* autosómicos se alcanza tras una generación.

Así mismo, se analizó el desequilibrio de ligamiento de cada par de *loci* que analiza la independencia de la transmisión de los microsatélites seleccionados. Los valores significativos fueron ajustados mediante la razón de falsos descubrimientos (RFD) para múltiples comparaciones. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el programa GeneAlex 6.5 (Peakall y Smouse 2006). Para determinar el coeficiente de parentesco entre los individuos de cada grupo (juveniles y adultos) de cada población, se emplearon simulaciones de Monte Carlo con el programa COANCESTRY 1.0, utilizando el estimador de probabilidad triádico (TrioML; Wang 2007). Para cada grupo se creó una submuestra de individuos que excluyó los hermanos completos eliminando uno de los individuos de aquellas parejas con una relación de parentesco r (TrioML) $>0,5$. Esta submuestra se creó como una medida conservadora con la que determinar si los resultados podrían haber estado condicionados por la presencia de individuos estrechamente relacionados.

La diversidad genética intrapoblacional fue evaluada considerando: número de alelos (K; cada una de las posibles formas alternativas de un gen), riqueza alélica (RA; medida del número de alelos que es independiente del tamaño muestral) basada en 14 individuos diploides (FSTAT 2.9.3; Goudet 1995), número de alelos privados (PA; alelos exclusivos de una población; GeneAlex 6.5), heterocigosidad observada (H_o ; proporción observada de *loci* heterocigóticos por individuo) y heterocigosidad esperada no sesgada (H_e ; proporción esperada de *loci* heterocigóticos por individuo en una población con cruzamientos al azar; Genetix 4.0). Se determinó la existencia de diferencias en la diversidad y el coeficiente de endogamia o consanguinidad intrapoblacional (F_{IS}) entre las dos localidades estudiadas utilizando el programa FSTAT y 1.000 permutaciones. La diferenciación genética entre poblaciones se estimó utilizando F_{ST} en Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer 2010). La significancia se determinó utilizando 10.000 permutaciones. Todos los análisis también fueron realizados con la submuestra excluyendo los hermanos completos (AR basada en 10 individuos diploides).

Para investigar los cambios demográficos en las dos poblaciones de la isla de Gran Canaria, se exploró las señales genéticas de cuello de botella y expansión poblacional. Se utilizó el test de Wilcoxon de doble cola de exceso de

heterocigotos en el programa Bottleneck 1.2 (Cornuet y Luikart 1996), usando 10.000 interacciones y un modelo de mutación de dos fases (TPM por sus siglas en inglés) con un 90 % de las mutaciones siguiendo el modelo de mutación por pasos (SMM por sus siglas en inglés) y un 10 % bajo el modelo de alelos infinitos (IAM por sus siglas en inglés). Además, se determinó la existencia de expansión poblacional examinando las desviaciones del equilibrio de mutación-deriva mediante el test K *intra-locus* y el test G *inter-locus* (Reich et al. 1999) en el programa KGTESTS (Bilgin 2007). El valor significativo de G en el KGTESTS se determinó utilizando una tabla de valores de corte para un determinado número de *loci* y tamaño muestral y un nivel de significación del 0,05 (Reich et al. 1999). Finalmente, se determinó el N_e de ambas localidades utilizando dos programas diferentes, Colony 2.0 (Jones y Wang 2010) que estima N_e a partir de las asignaciones de hermandad usando un método de máxima verosimilitud y apareamiento aleatorio, y N_e Estimator que utiliza tres aproximaciones: (a) desequilibrio de ligamiento, (b) exceso de heterocigotos y (c) coancestría molecular (Do et al. 2013).

Tabla 2. Microsatélites amplificados en las muestras de culebra real de California de los núcleos de Gáldar y Telde. Se muestra la fluorescencia utilizada en el cebador directo para la amplificación de cada *locus* (Fluoresc.), la secuencia de nucleótidos de los cebadores directo y reverso, la reacción de PCR multiplex donde se amplificó cada marcador, así como la concentración de los cebadores (Conc. Ceb.) en cada PCR.

Locus	Fluoresc.	Cebador directo	Cebador reverso	Multiplex	Conc. Ceb. (µM)
<i>L. getula 6</i>	<i>FAM</i>	TGAAGATCTGCTACAACCTTCCC	CGATGAGTCAGACATGACTTTGC	1	1
<i>L. getula 16</i>	<i>PET</i>	TATGTCGAGGAGCCAAGTCC	TGCATCACTAACCACGACCC	1	2
<i>L. getula 26</i>	<i>NED</i>	AGAGGGAGACCCATTTTCAGC	GGGACACCTTGCTAATTCCC	1	2
<i>L. getula 3</i>	<i>VIC</i>	AGGGTTAGCCACTTTAGCAAGG	CATGTACGTTCTGAGAGATGACCC	2	1
<i>L. getula 23</i>	<i>FAM</i>	TCTTTGCTCTCGTCTGTGGC	CCATGACTTCCTTGAACCG	2	1
<i>L. getula 21</i>	<i>PET</i>	GAGGACTACCTCTACCACTTTGGC	CACCATCTGAACCTTACATTCCTGC	2	2
<i>L. getula 14</i>	<i>NED</i>	AGGAAGTCAGAAGCAGGTTGG	GCTCAGGTCTGCTTTAAGAAATGC	2	1
<i>L. getula 5</i>	<i>VIC</i>	GCAGGATAGACTGAGATGCTCC	CTACCAGGCCCAATGAAAGG	1	2
<i>L. getula 15</i>	<i>NED</i>	CATTAACCCACGTAGTGTGGC	CTGATGGTCTCCATGGTTGC	2	3
<i>L. getula 1</i>	<i>FAM</i>	TCTGTCTTGCACTTTCTCAAGC	CATTAACAGTGGTAGCTCTCTGCC	1	3
<i>L. getula 2</i>	<i>PET</i>	GATGGATGATGGCTACACCG	AAACCATCTCCTCCTCCACG	1	2
<i>L. getula 25</i>	<i>NED</i>	AAACACCTTTGGGACATCGG	TTGCCACACCTTGTAGATTGC	1	2
<i>L. getula 9</i>	<i>VIC</i>	GGCAATGAGCAAAGTAAGCC	TTGGCTTCTGAGTAAACACGC	2	2

3. Resultados

3.1 ERRORES DE GENOTIPADO, EQUILIBRIO DE HW Y DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

No se detectaron errores de genotipado que se debieran a la falta de amplificación de uno de los dos alelos (*Allele Dropout*), o a errores en la denominación de los alelos (Scoring Error). Así mismo, no se encontraron evidencias de la existencia de alelos nulos excepto en el *locus L. getula 23*, que presentó un número de homocigotos significativamente superior al esperado (número de homocigotos esperado = 8,47; número de homocigotos observado = 15). El elevado número de homocigotos podría deberse a la existencia de alelos nulos, es decir, falta de un alelo debido a fallos durante la amplificación como consecuencia de sustituciones, deleciones o inserciones en las secuencias que corresponden a los sitios de unión de los cebadores.

En Gáldar, el *locus L. getula 23* se desvió significativamente del equilibrio de HW tras aplicar la RFD ($p < 0,001$), mientras que en Telde, tres *loci* (*L. getula 1*, *L. getula 14* y *L. getula 23*) mostraron desviaciones significativas ($p < 0,012$), indicando un déficit de heterocigotos (exceso de homocigotos). Debido a los resultados anteriores, los siguientes análisis se realizaron excluyendo el *locus L. getula 23*. El número de *loci* con exceso de homocigotos fue inferior en los juveniles (Gáldar $n=1$; Telde $n = 3$) que en los adultos de ambas poblaciones (Gáldar $n = 7$; Telde $n = 6$), lo que señala un mayor equilibrio genético de las poblaciones debido, probablemente, al mayor tiempo transcurrido desde su introducción.

El análisis de desequilibrio de ligamiento, que analiza la segregación independiente de alelos de genes diferentes, fue únicamente significativo tras aplicar la RFD en 1 de las 156 comparaciones a pares (entre *loci* y considerando las dos poblaciones; *Loci L. getula 5* y *L. getula 14* en Telde, $p = 0,008$), no sugiriendo la existencia de genes ligados. Así mismo, seis individuos de la población de Telde, que fallaron en la amplificación de algunos marcadores, fueron eliminados de los posteriores análisis tras comprobar que su inclusión podía afectar a los resultados.

3.2 DIVERSIDAD GENÉTICA Y COEFICIENTE DE PARENTESCO DE LOS JUVENILES DE GÁLDAR Y TELDE

El análisis de parentesco reveló 4 (27 %) y 8 (21 %) individuos de Gáldar y Telde, respectivamente, con un coeficiente de parentesco r (TrioML) $>0,5$; equivalente al parentesco de hermanos completos. Los análisis posteriores se realizaron con el total de los individuos y una submuestra que descartó estos ejemplares.

No se encontraron diferencias significativas en RA ($p = 0,324$; Figura 1), H_o ($p = 0,324$) y H_e ($p = 0,324$) (Tabla 3) al comparar los juveniles de Gáldar con los de Telde, indicando que los valores de diversidad genética fueron similares para ambas localidades. Así mismo, no se encontraron diferencias significativas en estos valores entre los juveniles y los adultos de Telde ($p >0,358$) o entre los juveniles y los adultos de Gáldar ($p >0,310$), señalando la ausencia de variaciones temporales en la diversidad genética de ambos núcleos. Tampoco se encontraron diferencias en el coeficiente de endogamia (F_{IS}), que mide la probabilidad de que dos alelos de un gen en un mismo individuo sean idénticos por descendencia, entre los juveniles de ambas poblaciones ($p = 0,324$), ni entre los juveniles y adultos de cada población ($p >0,310$; Tabla 3). Todos los resultados se mantuvieron al eliminar los hermanos completos.

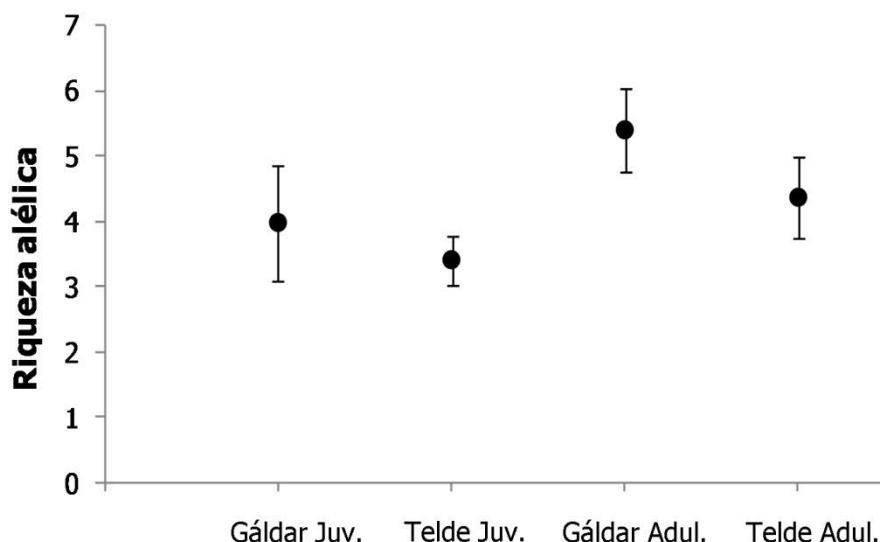


Figura 1. Riqueza alélica basada en 14 individuos diploides de juveniles (este estudio) y adultos (análisis anterior) de culebra real de California de Gáldar y Telde. Se representa la media y el intervalo de confianza al 95 %. Juveniles, Juv.; Adultos, Adul. Se utilizaron 12 microsatélites, descartando *L. getula* 23.

El coeficiente de parentesco, que mide el parentesco entre dos individuos y representa la probabilidad de que dos genes –tomados aleatoriamente de cada individuo– sean idénticos por descendencia, fue significativamente superior en los juveniles de Gáldar ($r = 0,12$) que en los adultos ($r = 0,08$; Figura 2A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el coeficiente de los juveniles ($r = 0,11$) y el de los adultos de Telde ($r = 0,09$; Figura 2B).

Tabla 3. Diversidad genética de los juveniles y adultos de culebra real de California de los núcleos de Gáldar y Telde basada en 12 microsatélites (excluido *L. getula 23*). Se muestra el valor medio y entre paréntesis la desviación típica. H_o , heterocigosidad observada; H_e , heterocigosidad esperada; K , número de alelos; RA , riqueza alélica ($n = 14$); PA , alelos privados; F_{IS} , coeficiente de endogamia.

	Gáldar juveniles	Telde juveniles	Gáldar adultos	Telde adultos
H_o	0,64 (0,17)	0,54 (0,14)	0,52 (0,13)	0,51 (0,13)
H_e	0,59 (0,15)	0,57 (0,10)	0,66 (0,10)	0,64 (0,10)
K	4,00 (1,71)	3,92 (1,16)	6,67 (1,87)	5,17 (1,59)
AR	3,98 (1,63)	3,41(0,68)	5,40 (1,17)	4,37 (1,15)
PA	0,33 (0,58)	0,42 (1,15)	2,25 (1,25)	1,67 (1,51)
F_{IS}	-0,08 (0,13)	0,05 (0,17)	0,21 (0,14)	0,21 (0,14)

3.3 DISTANCIA GENÉTICA Y CAMBIOS DEMOGRÁFICOS

3.3.1. Distancia genética entre las poblaciones

El ACP reveló la existencia de un grupo de juveniles en Telde y otro en Gáldar (Figura 3). Estos resultados contrastan con los obtenidos en el ACP de los adultos, donde se observaron un total de tres grupos genéticamente diferenciados, dos de ellos (Grupos A y B) en la localidad de Telde y el tercero (Grupo C) en Gáldar (Figura 3). Ninguno de los juveniles de Telde se agrupó con los individuos del Grupo B, que representó el 20 % de los adultos analizados en esta localidad. Los juveniles de Telde y Gáldar presentaron una distancia genética significativa ($F_{ST} = 0,242$, $p < 0,001$; Figura S1 en Anexo I), similar a la distancias encontradas entre los ejemplares adultos de ambas localidades ($F_{ST} = 0,184$, $p < 0,001$) y entre los adultos de Gáldar y el grupo A de Telde ($F_{ST} = 0,207$, $p < 0,001$).

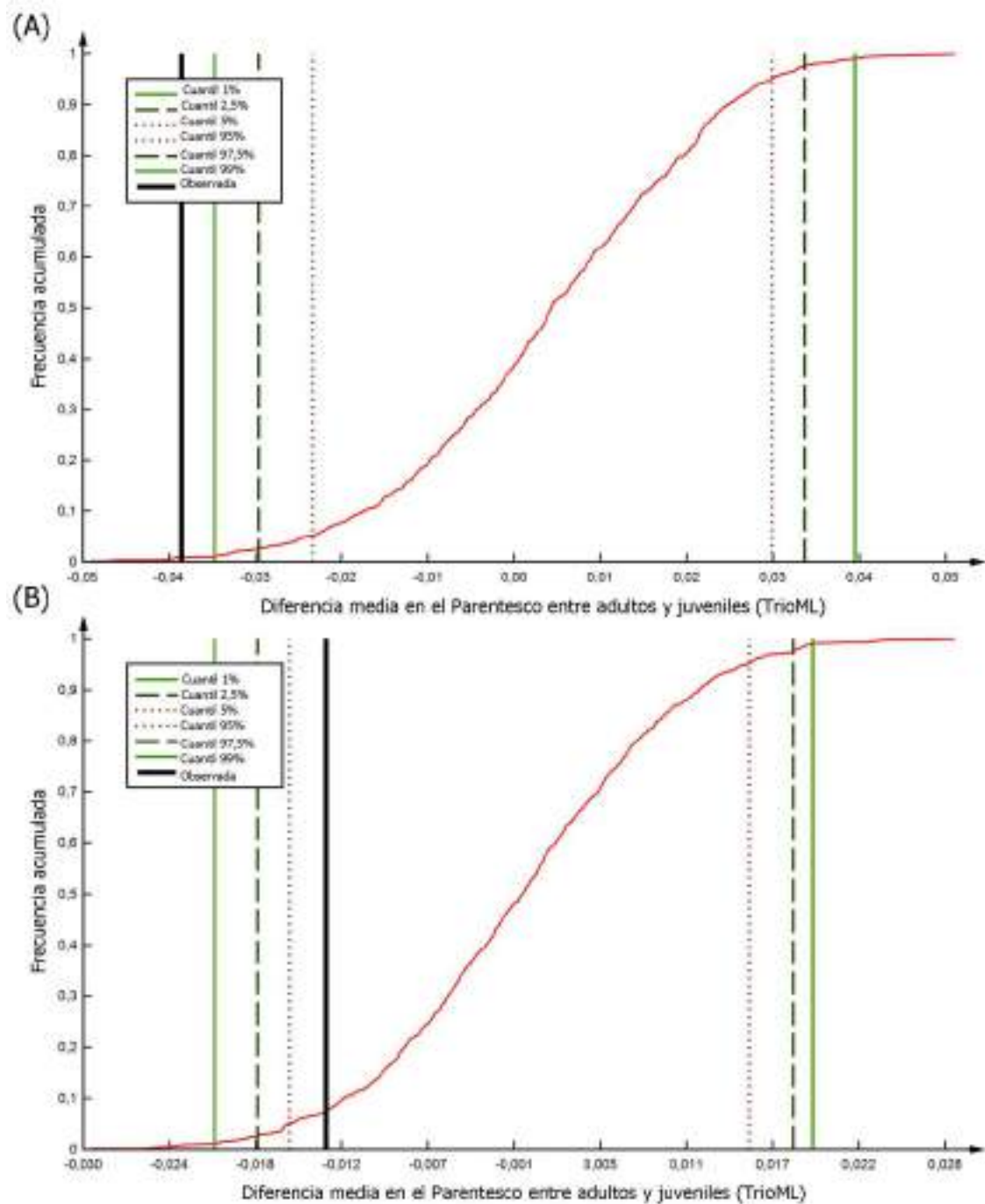


Figura 2. Diferencia media en el coeficiente de parentesco (Trio ML) entre adultos y entre juveniles de Gáldar (A) y Telde (B).

No se encontró una diferenciación genética entre los juveniles y adultos de Gáldar ($F_{ST} = 0,007$, $p = 0,225$), pero sí se detectó entre los juveniles y

adultos de Telde ($F_{ST} = 0,022$, $p = 0,009$). Esta diferencia genética se debe probablemente a la ausencia de juveniles pertenecientes al Grupo B, presente entre los ejemplares adultos, ya que la distancia no fue significativa cuando se compararon los juveniles con los adultos del Grupo A de Telde ($F_{ST} < 0,001$, $p = 0,531$). Además, la diferenciación genética desapareció cuando se eliminaron los hermanos completos del análisis ($F_{ST} = 0,010$, $p = 0,189$). El análisis de asignación de los juveniles, basándose en sus genotipos, asignó el 100 % de los juveniles a la localidad donde se habían capturado, no revelando ningún caso de individuo migrante o movido por el hombre.

3.3.2. Cambios demográficos

El número observado de *loci* con exceso de heterocigotos ($n = 6$) fue igual al número observado de *loci* con déficit de heterocigotos ($n = 6$), y similar al número esperado de *loci* con exceso de heterocigotos ($n = 7,15$; $p = 0,345$). En una población cuyo N_e ha permanecido constante a lo largo del tiempo, existe aproximadamente la misma probabilidad de que un *locus* muestre exceso o déficit de heterocigotos (Shriver et al. 1993). La existencia de un cuello de botella (reducción del tamaño poblacional), llevaría a encontrar un número de *loci* con exceso de heterocigotos significativamente superior. Bajo el modelo de mutación de dos fases (TPM: 90 % SMM y 10 % IAM), la población de Gáldar tampoco mostró señales de haber sufrido una reducción del tamaño poblacional ($p = 0,301$). El análisis de la distribución de frecuencias alélicas descartó igualmente un cuello de botella reciente en la población de Gáldar, mostrando una distribución "en forma de L" (Figura 4A; Luikart y Cornuet 1998), es decir, que hay una mayor proporción de alelos en frecuencias bajas (rango 0,001-0,1) que en frecuencias intermedias. El caso contrario sería el esperado para una población con cuello de botella. Los resultados de la población de Gáldar descartan la existencia de un cuello de botella reciente en la población. La distribución de frecuencias alélicas de los juveniles de Gáldar tuvo algunas diferencias respecto a la de los adultos, siendo más parecida a la distribución encontrada tanto en juveniles como adultos de Telde.

El aumento del tamaño población se examinó con los tests K *intra-locus* y G *inter-locus*, que examinan desviaciones del equilibrio de mutación y deriva. El test K *intra-locus* no encontró evidencias de expansión poblacional en Gáldar ($p = 0,842$), mientras que los resultados del G-test se situaron en el límite de la significación (valor $g = 0,231$), sugiriendo un aumento del tamaño poblacional. Estos resultados se mantuvieron al eliminar a los hermanos completos.

En Telde, el número de *loci* esperados con exceso de heterocigotos ($n = 7,10$) fue similar al número de *loci* observados con exceso de heterocigotos ($n = 7$) y próximo al número de *loci* observados con déficit de heterocigotos ($n = 5$; $p = 0,585$). Los resultados del programa Bottleneck, utilizando el modelo de mutación de dos fases (TPM: 90 % SMM y 10 % IAM), también descartaron la existencia de un cuello de botella reciente en el núcleo de Telde ($p = 0,301$), indicando que los juveniles de esta población representan una población estable. Así mismo, los resultados del análisis de la distribución de frecuencias alélicas señalaron una distribución “en forma de L” (Figura 4B), descartando la existencia de un cuello de botella reciente en la población de Telde. De forma similar, los valores del K-test ($p = 0,985$) y del G-test (valor $g = 0,681$), descartaron la existencia de una expansión poblacional en el núcleo de Telde. Todos los resultados se mantuvieron cuando se descartaron los hermanos completos del análisis.

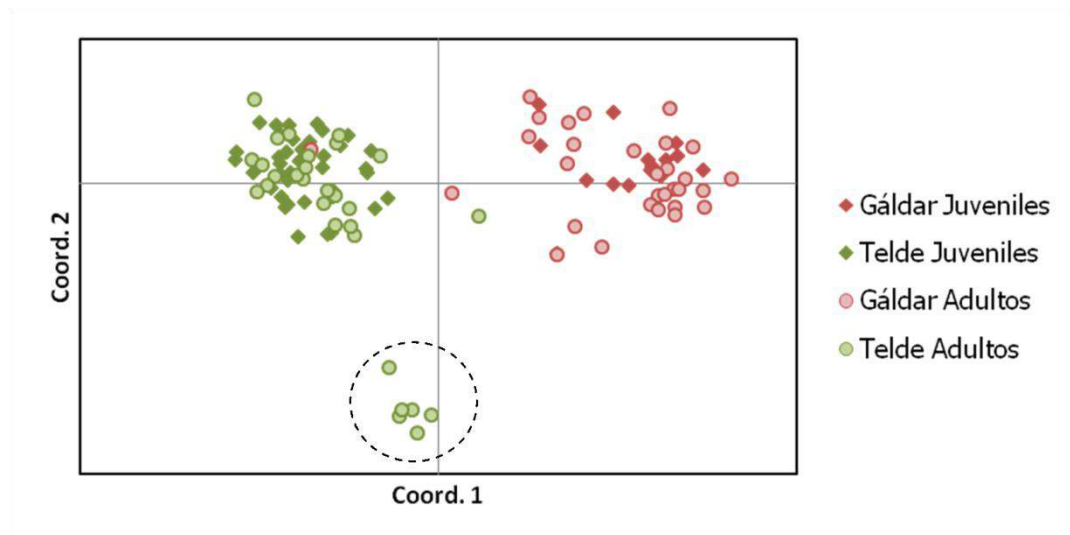


Figura 3. Análisis de componentes principales (ACP) de los juveniles y adultos de culebra real de California de Gáldar y Telde. El círculo señala el Grupo B identificado en el análisis de los adultos de Telde y ausente entre los juveniles de la misma localidad.

3.4 TAMAÑO EFECTIVO DE LAS POBLACIONES DE GÁLDAR Y TELDE

N_e se define como el número de adultos que contribuyen a la composición genética de la generación siguiente. Generalmente N_e es menor que el tamaño de la población (Hartl y Clark 1997). Aunque las estimaciones de N_e variaron según la aproximación utilizada, todos los métodos fueron consistentes a la hora de estimar tamaños efectivos poblacionales de los juveniles de Gáldar

iguales o incluso inferiores a los de los adultos. Sin embargo, en el caso de los juveniles de Telde, la mayoría de las estimaciones de N_e fueron iguales o superiores que en el caso de los adultos. Además, la población de Gáldar presentó valores de N_e superiores a los de Telde en el caso de los adultos; sin embargo, los juveniles de Telde presentaron unas estimaciones de N_e mayores que las de los juveniles de Gáldar (Tabla 4).

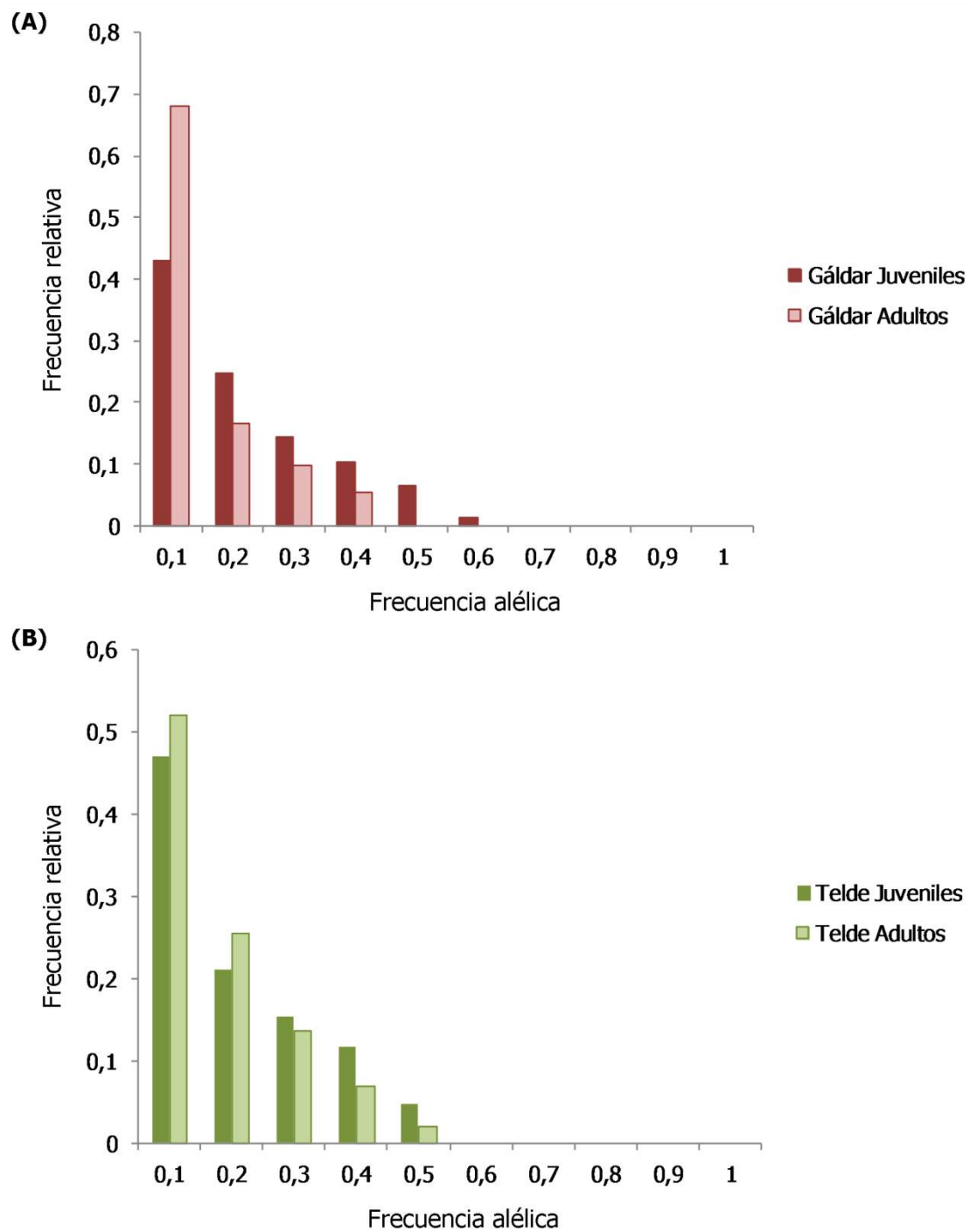


Figura 4. Distribución de frecuencias alélicas de 12 microsatélites analizados en los juveniles y adultos de las dos poblaciones de culebra real de California de la isla de Gran Canaria. Se observa una distribución “en forma de L” para los juveniles y adultos de los núcleos de Gáldar (A) y Telde (B). Los valores a lo largo del eje X representan el valor máximo para cada clase de frecuencia de los alelos de los *loci* (la primera clase representa alelos con frecuencias entre 0,01 y 0,1; la segunda, entre 0,1 y 0,2; etc.).

Tabla 4. Tamaño efectivo poblacional (N_e) de los adultos y juveniles de culebra real de California para las poblaciones de Gáldar y Telde, estimados con distintas aproximaciones en los programas N_e Estimator y Colony. Se muestra la media y el intervalo de confianza al 95 %. Se incluyen los resultados del análisis considerando todos los individuos y la submuestra tras descartar los hermanos completos (HC) y los individuos asignados genéticamente a una población distinta de la que fueron muestreados (asig. otras pob.). Desequilibrio de ligamiento, Deseq. Ligam.; Heterocigotos, heteroc.; Verosimilitud, verosim.

	N_e Estimator			Colony
	Deseq. Ligam.	Exceso heteroc.	Coancestría molecular	Máxima verosim.
ADULTOS				
Todos los individuos				
Gáldar (n = 30)	19,0 (12,9; 30,4)	Infinito	2,6 (1,8; 3,5)	47 (28; 83)
Telde (n = 30)	4,1 (2,9; 6,1)	Infinito	2,2 (1,7; 2,7)	29 (17; 53)
Descartando HC				
Gáldar (n = 21)	20,2 (13,2; 35,3)	Infinito	4,0 (2,4; 5,9)	49 (27; 109)
Telde (n = 18)	11,7 (7,6; 19,2)	Infinito	1,9 (1,3; 2,3)	34 (18; 83)
Descartando HC y asig. otras pob.				
Gáldar (n = 20)	18,6 (11,8; 34,3)	Infinito	3,6 (2,3; 5,2)	45 (25; 104)
Telde (n = 17)	12,1 (7,1; 22,8)	Infinito	4,9 (2,4; 8,3)	39 (19; 123)
JUVENILES				
Todos los individuos				
Gáldar (n = 15)	12,1 (5,7; 33,7)	Infinito	3,7 (1,9; 6,0)	16 (8; 40)
Telde (n = 39)	416,4 (64,7; Infinito)	Infinito	13,7 (1,6; 38,2)	35 (21; 62)
Descartando HC				
Gáldar (n = 11)	10,6 (4,0; 38,7)	Infinito	4,2 (1,9; 7,5)	24 (11; 73)
Telde (n = 31)	Infinito	Infinito	12,6 (0,9; 39,2)	26 (15; 47)

4. Conclusiones y recomendaciones

La reducción drástica del tamaño poblacional, proceso conocido como cuello de botella, es un hecho relativamente frecuente en las poblaciones amenazadas, que resulta en la pérdida de diversidad genética y potencial de evolución. Además, la reducción de la diversidad genética y los cambios en la distribución de frecuencias alélicas resultan mucho más acusados en los cuellos de botella intensos (que ocurren en unas pocas generaciones), que en los difusos (menos drásticos y a lo largo de varias generaciones; England et al. 2003).

Mientras que los adultos de Gáldar y Telde presentaron un alto número de *loci* con exceso de homocigotos (Gáldar $n = 7$; Telde $n = 6$), los juveniles de estas dos poblaciones mostraron un menor número (Gáldar $n = 1$; Telde $n = 3$), señalando un mayor equilibrio genético de las poblaciones debido, probablemente, al mayor tiempo transcurrido desde su introducción.

En general, no se encontraron diferencias significativas en la diversidad molecular (K , RA , H_o) entre los juveniles de ambas poblaciones, considerando tanto el total de los individuos analizados como la submuestra tras descartar los hermanos completos ($r > 0,5$). De forma similar, no se encontraron diferencias significativas en la variabilidad genética entre los juveniles y adultos de cada población. En Telde no se encontraron diferencias significativas en el coeficiente de parentesco entre juveniles y adultos. Sin embargo, el coeficiente de parentesco de los juveniles de Gáldar fue significativamente superior al de los adultos de la misma localidad, lo que sugiere una reducción de los individuos reproductores en esta población, que también explicaría el escaso número de juveniles capturados en esta localidad.

El ACP no detectó ningún juvenil perteneciente al Grupo B de Telde, por lo que este grupo, formado por individuos estrechamente relacionados entre sí y que representó el 20 % de los adultos de Telde analizados, podría haber disminuido su frecuencia o incluso desaparecido de dicha localidad. Este hecho originó que los juveniles de Telde presentaran diferencias genéticas significativas respecto a los adultos de esta localidad.

La estructura genética entre los juveniles de Telde y Gáldar corrobora el aislamiento reproductivo entre ambas localidades. La ausencia de individuos asignados a una población distinta de aquella en donde fueron capturados y la

estructura genética encontrada señalan que el movimiento de individuos entre ambas localidades es inapreciable o inexistente.

Aunque el resultado del test de expansión poblacional G-test, se situó en el límite del nivel de significación establecido en Gáldar, el test K *intra-locus* no encontró evidencias de un aumento de dicha población. Por su parte, el programa Bottleneck no encontró evidencias de un cuello de botella reciente en la población. En Telde, no se encontraron evidencias de una reducción o expansión de la población, sugiriendo que ambas localidades presentan unas poblaciones estables.

Sin embargo, se encontraron diferencias temporales en los valores de N_e . En Gáldar, las estimaciones de N_e parecen señalar una disminución del tamaño efectivo en esta localidad. Las estimaciones de N_e de los juveniles de Gáldar fueron iguales o inferiores a los de los adultos de esta localidad. A pesar de que los adultos de Gáldar presentaron valores de N_e superiores a los adultos de Telde, las estimaciones de N_e en el caso de los juveniles fueron inferiores en Gáldar que en Telde. En Telde, los valores de N_e de los juveniles fueron iguales o superiores a los de los adultos, indicando un aumento del tamaño efectivo en esta población.

El análisis genético de los juveniles de Gáldar y Telde señaló la existencia de dos poblaciones estables. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias en las frecuencia alélicas, el parentesco y el tamaño efectivo poblacional entre los juveniles y los adultos previamente analizados en una fase anterior del proyecto. La población de Gáldar presentó valores de N_e inferiores en los juveniles que en los adultos y el coeficiente de parentesco de los juveniles fue superior al de los adultos de esta localidad. Estos resultados podrían estar relacionados con las capturas realizadas durante el proyecto en esta localidad así como las condiciones poco idóneas del ecosistema. En Telde, las estimaciones de N_e de los juveniles fueron superiores a los de los adultos, por lo que el esfuerzo de capturas debe aumentarse en esta localidad. Sin embargo, es importante destacar que el Grupo B identificado en los adultos de esta población no fue detectado en la muestra de juveniles analizados.

Basándose en los resultados anteriormente expuestos se recomienda:

- Controlar la dispersión de la culebra real de California de los núcleos de Gáldar y Telde para evitar la mezcla de ambas

poblaciones (con el correspondiente aumento de la diversidad genética), la colonización de nuevas áreas dentro de la isla de Gran Canaria así como la dispersión a otras islas del archipiélago.

- Los resultados genéticos obtenidos reflejan episodios ocurridos en las generaciones anteriores a las de los individuos analizados. Es necesario continuar con la captura de ejemplares en ambas poblaciones, de forma que la reducción de la población produzca una señal genética en las nuevas generaciones.
- Aumentar el esfuerzo de captura en la población de Telde, donde las capturas realizadas no parecen haber tenido un efecto en la variabilidad genética de las nuevas generaciones.

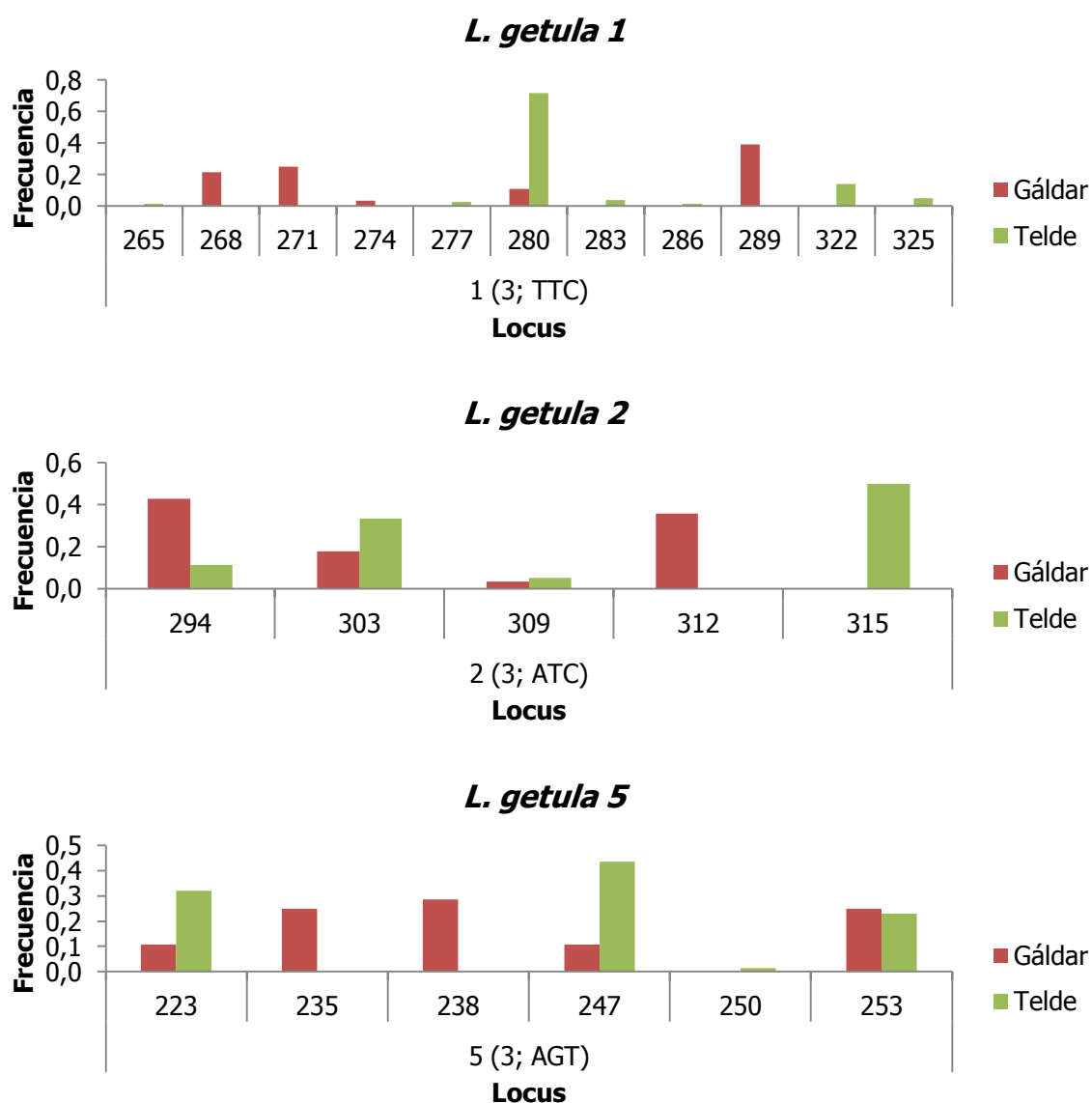
5. Referencias

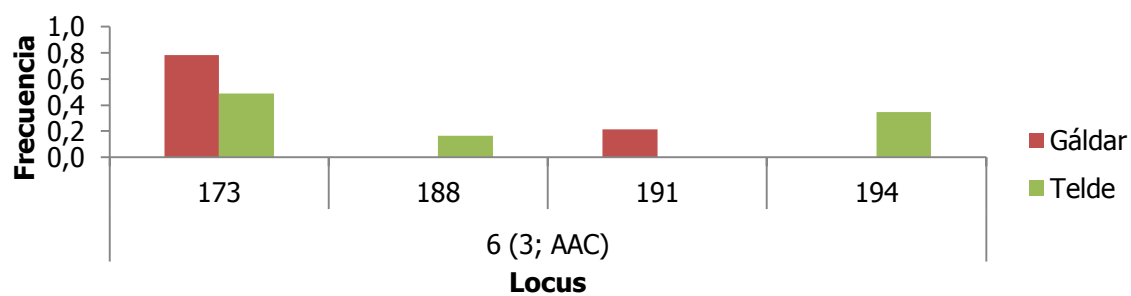
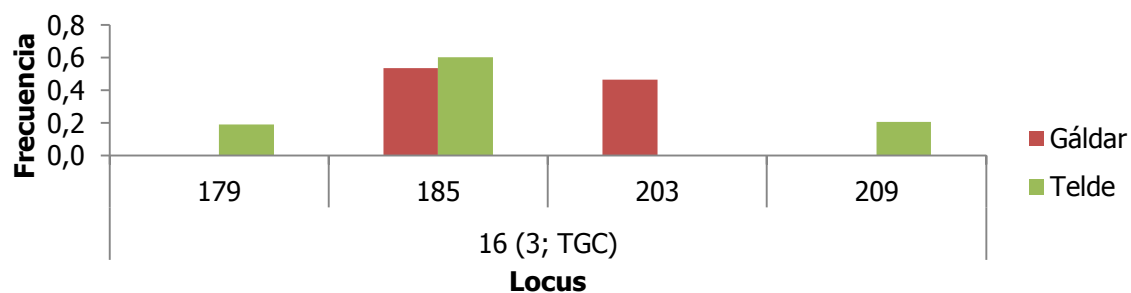
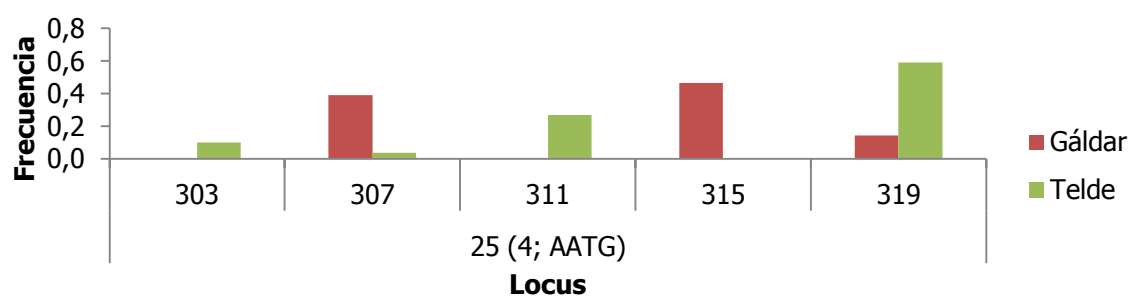
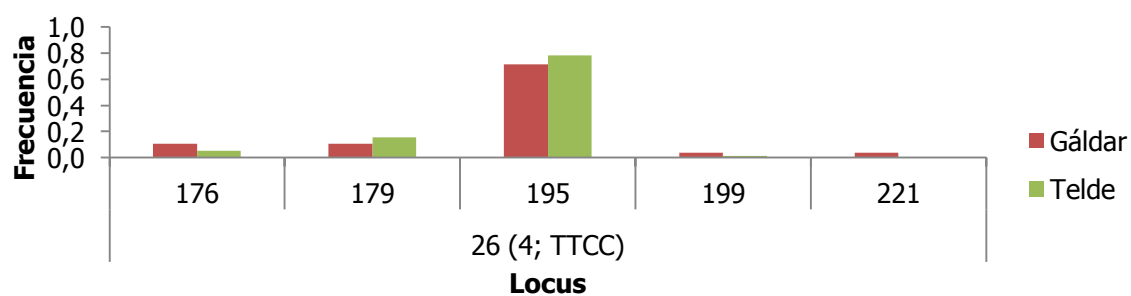
- Bilgin, R. 2007. Kgttests: a simple Excel Macro program to detect signatures of population expansion using microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 7:416-417.
- Carroll, S. P. 2007. Natives adapting to invasive species: ecology, genes, and the sustainability of conservation. *Ecological Research* 22: 892-901.
- Cornuet, J. M., G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Do, C., Waples, R.S., Peel, D., MacBeth, G.M., Tillett, S.B.J., Ovenden, J.R. 2014. N_EESTIMATOR v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14: 209-214.
- England, P.R., Osler, G.H.R., Woodworth, L.M., Montgomery, M.E., Briscoe, D.A., Frankham, R. 2003. Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. *Conservation Genetics* 4: 595-604.
- Excoffier, L., H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485-486.
- Gurevitch, J., D. Padilla. 2004. Are invasive species a major cause of extinctions? *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* 19: 470-474.
- Hartl, D. L., A. C. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. Third edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Jones, O. R., J. Wang. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10:551-555.
- Kowarik, I. 2003. Human Agency in Biological Invasions: Secondary Releases Foster Naturalisation and Population Expansion of Alien Plant Species. *Biological Invasions* 5:293-312.
- Lockwood, J.L., Cassey, P., Blackburn, T. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20: 223-228.
- Luikart, G., J.M. Cornuet. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12(1):228-237.

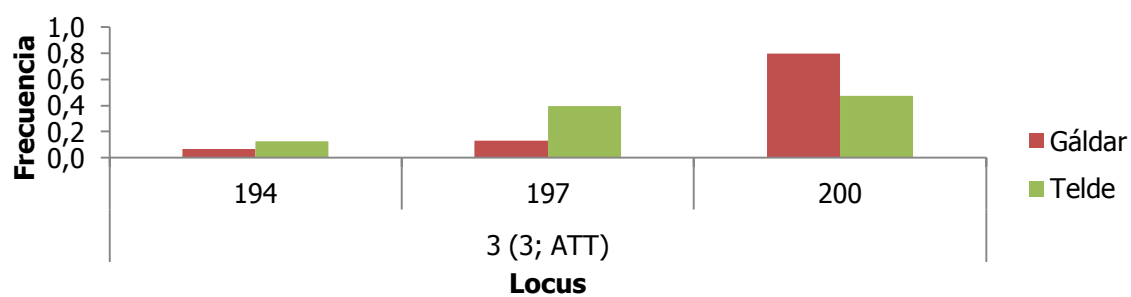
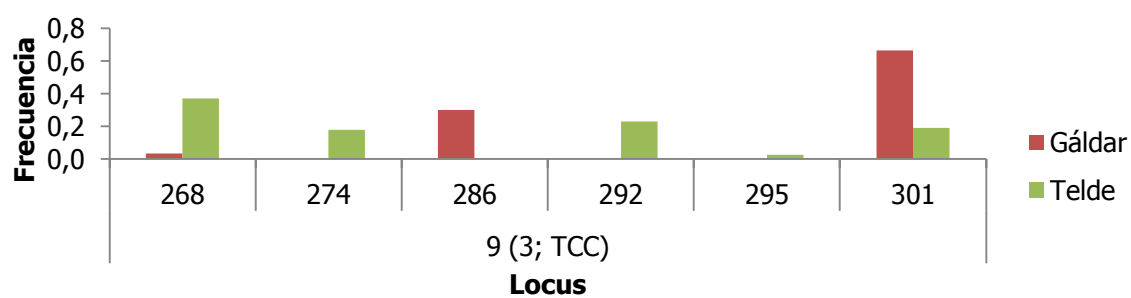
- Monzón-Argüello, C., Patiño-Martínez, C., Christiansen, F., Gallo-Barneto, R., Cabrera-Pérez, M.A., Peña-Estévez, M.A., López-Jurado, L.F., Lee, P.L.M. Snakes on an island: variation in morphology, genetics and predation of endemic fauna of a recently introduced predator. Conservation genetics, en prensa.
- Patiño, C. 2012. Obtención de parámetros biológicos de ejemplares de *Lampropeltis getula Californiae*. Informe año 2012, 42 pp. Proyecto LIFE10 NAT/ES/000565.
- Peakall, R., P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, 288-295
- Reich, D. E., M. W. Feldman, D. B. Goldstein. 1999. Statistical Properties of Two Tests that Use Multilocus Data Sets to Detect Population Expansions. Molecular Biology and Evolution 16:453.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8: 103-106.
- Toonen, R.J., S. Hughes S. 2001. Increased throughput for fragment analysis on ABI Prism 377 Automated Sequencer using a membrane comb and STRand Software. Biotechniques 31:1320-1324.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Resources 4: 535-538.
- Wang, J. 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. Genetical Research 89: 135-153.

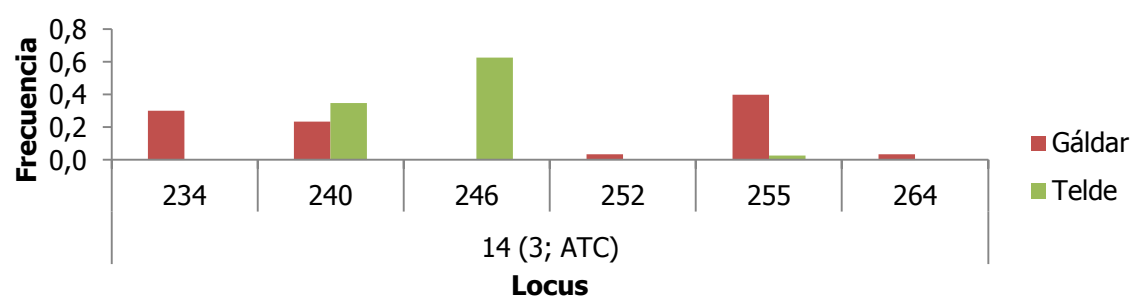
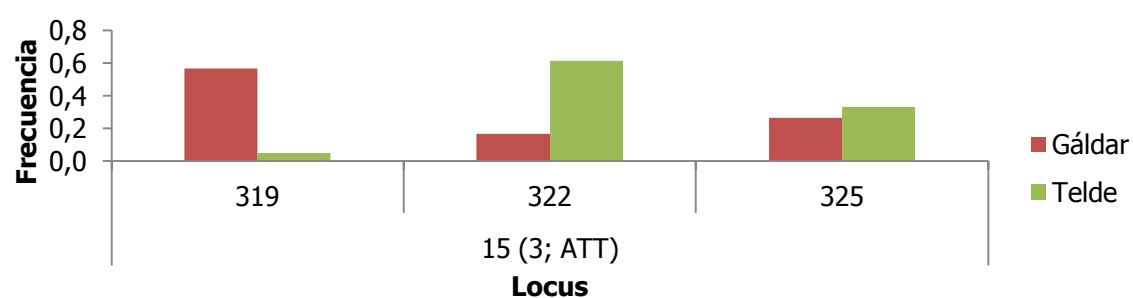
6. Anexo I

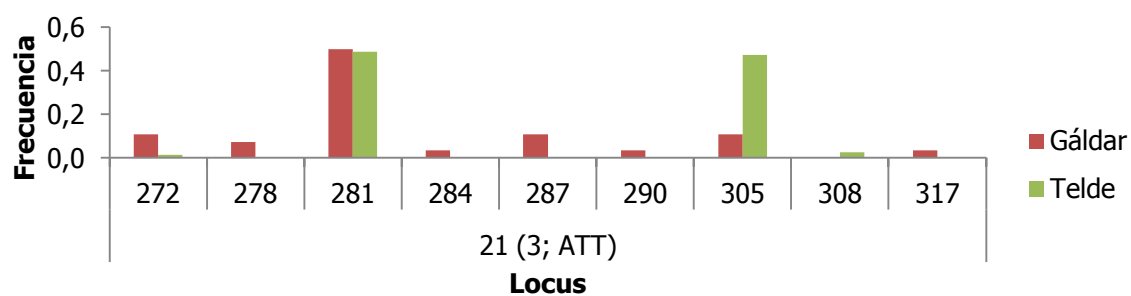
Figura S1. Distribución de frecuencias alélicas para cada uno de los 13 loci analizados en los juveniles de culebra real de California de las poblaciones de Gáldar y Telde. Se indica el número de nucleótidos así como la composición del motivo de repetición.



L. getula 6***L. getula 16******L. getula 25******L. getula 26***

L. getula 3***L. getula 9***

L. getula 14***L. getula 15***

L. getula 21***L. getula 23***