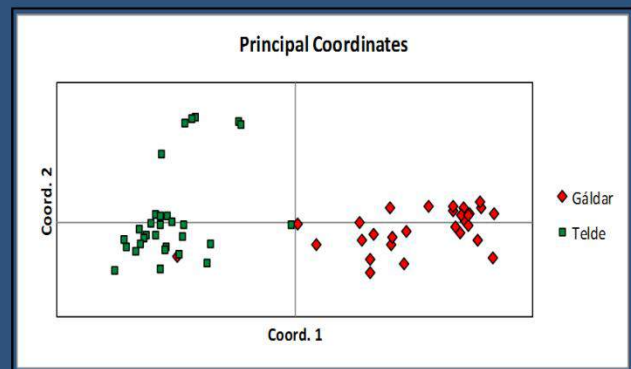
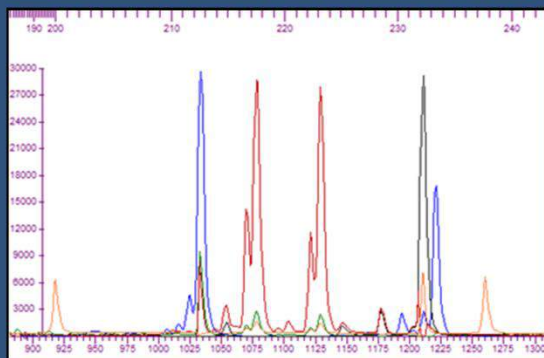


ANÁLISIS GENÉTICO DE EJEMPLARES DE *LAMPROPELTIS GETULA* CAPTURADOS EN 2007-2011

LIFE10 NAT/ES/000565



ANÁLISIS GENÉTICO DE EJEMPLARES DE *LAMPROPELTIS GETULA* CAPTURADOS EN 2007-2011

**CONTROL DE LA ESPECIE EXÓTICA INVASORA *LAMPROPELTIS
GETULA CALIFORNIAE* EN LA ISLA DE GRAN CANARIA (LIFE10
NAT/ES/000565)**

Mayo 2013



Índice

1. Introducción.....	2
2. Marcadores microsatélites identificados en la genoteca.....	3
3. Protocolo de selección de los microsatélites utilizados.....	4
4. Protocolo de toma de muestras y análisis genéticos.....	5
5. Resultados	10
6. Conclusiones.....	20
7. Recomendaciones finales	23
8. Referencias	24
9. Anexo I	27

1. Introducción

Las invasiones biológicas representan una de las principales amenazas para la diversidad global (Gurevitch y Padilla 2004). El proceso de invasión resulta en nuevas interacciones de especies y cambios en los ecosistemas, que producen con frecuencia cambios dramáticos en la biodiversidad nativa (Carroll 2007). Comprender los factores que determinan el éxito de una especie que se ha establecido en una nueva área, resulta imprescindible para evitar los potenciales impactos sociales, económicos y ecológicos que origina una invasión biológica.

Las fase inicial de la invasión representa un periodo de tiempo crítico para la adaptación de la especie a las condiciones locales (Sakai et al. 2001). La habilidad de una especie invasora para adaptarse a las nuevas condiciones no sólo depende del tamaño poblacional y de las diferencias ambientales entre el área natural y de introducción, sino, además, de la variabilidad genética. En teoría, las poblaciones invasoras presentan una diversidad genética reducida como consecuencia del bajo número de fundadores (proceso conocido como cuello de botella; Nei et al. 1975). Sin embargo, numerosos estudios han encontrado poblaciones invasoras con una diversidad genética igual o superior al de las poblaciones nativas, debido al uso de diferentes fuentes (poblaciones genéticamente diferenciadas entre sí) para la introducción (Kowarik 2003; Bossdorf et al. 2005; Crawford y Whitney 2010).

La culebra real de California (*Lampropeltis getula californiae*), especie nativa de Estados Unidos y México, fue introducida en Gran Canaria alrededor del año 1998 y, actualmente, se considera una especie invasora en la isla. Presenta una distribución discontinua con dos núcleos poblacionales: (1) un núcleo principal en Telde, que incluye los municipios de Telde, Santa Brígida, Valsequillo y San Mateo, y que presenta un mayor número de individuos; y (2) un núcleo secundario en Gáldar, con una menor densidad y un área de distribución más reducida. Además, ambos núcleos parecen diferenciarse fenotípicamente (patrón de coloración, tamaño y peso; Patiño 2012).

Los estudios genéticos son una herramienta útil a la hora de estudiar la ecología y evolución de las especies invasoras. Los microsatélites, que se definen como segmentos de ADN que contienen numerosas repeticiones en tándem de una secuencia de tema corto, normalmente de una a seis bases, son marcadores de elección en este tipo de estudios debido a su gran variabilidad y evolución relativamente rápida. Estos marcadores resultan fundamentales a la hora de estimar parámetros ecológicos de interés tales como la tasa de migración, tamaño efectivo de la población, cuellos de botella y parentesco. El presente informe incluye los resultados derivados del análisis de 13 marcadores microsatélites en individuos de la culebra real de California de los dos núcleos poblacionales existentes en Gran Canaria.

2. Marcadores microsatélites identificados en la Genoteca

El *Savannah River Ecology Laboratory*, unidad de investigación perteneciente a la Universidad de Georgia, desarrolló una librería de marcadores microsatélites a partir del ADN de dos ejemplares de *Lampropeltis* de la isla de Gran Canaria. A través de un secuenciador *Illumina*, se obtuvieron un total de 6.315 pares de cebadores, es decir, oligonucleótidos necesarios para la amplificación de los microsatélites por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la culebra real de California (Monzón-Argüello y López Jurado 2012). La librería incluyó microsatélites hexa-, penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos y motivos tanto simples como compuestos. Se seleccionaron 50 microsatélites tri- y tetranucleótidos para testar su polimorfismo en las dos poblaciones de esta isla. Es necesario encontrar marcadores microsatélites con niveles adecuados de polimorfismo para, posteriormente, amplificar estos *loci* en el total de las muestras.

3. Protocolo de selección de los microsatélites utilizados

El análisis del polimorfismo de 30 microsatélites (tri- y tetranucleótidos) fue suficiente para encontrar un número adecuado de marcadores que, posteriormente, serían amplificados en los individuos estudiados. Se realizó la extracción de ADN de 7 individuos utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN®). A continuación se amplificó los 30 microsatélites en cada una de las 7 muestras de ADN mediante PCR. Se realizó una electroforesis del producto de PCR con geles de agarosa a una concentración del 3,5% y un voltaje de 80 V durante 90 min. Debido a que las moléculas que son diferentes presentan una movilidad distinta en un campo eléctrico, los fragmentos con tamaños diferentes migran de forma distinta a través del gel. Así, los fragmentos más pequeños avanzan una distancia mayor desde el punto de aplicación de la muestra que los fragmentos más grandes. La existencia de bandas a diferentes distancias del punto de aplicación confirma la existencia de polimorfismo para ese marcador (Figura 1).

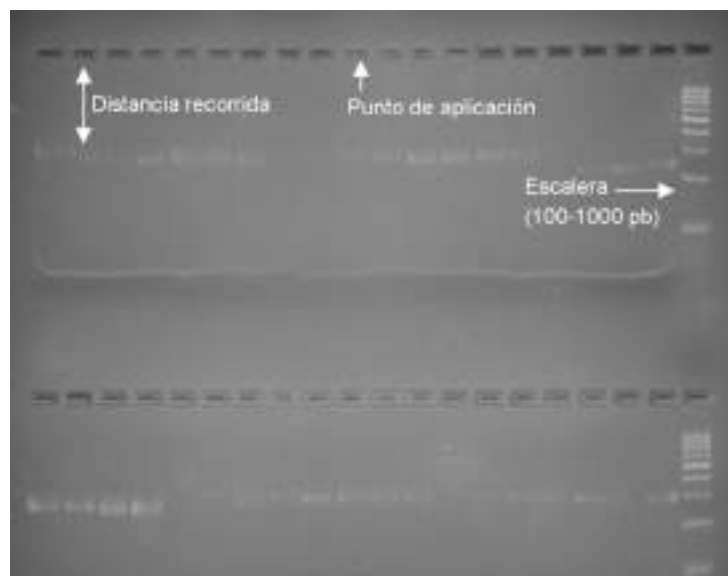


Figura 1. Gel de agarosa al 3,5% con los loci *L. getula* 1, *L. getula* 2, *L. getula* 14, *L. getula* 9 y *L. getula* 25 amplificados en 7 individuos de culebra real de California y un control negativo, excepto el locus *L. getula* 25 que sólo muestra la amplificación en 6 individuos de la especie. Las bandas a diferentes distancias del punto de aplicación señalan la existencia de varios alelos y, por tanto, polimorfismo.

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa revelaron un total de 13 loci polimórficos: *L. getula* 6, *L. getula* 16, *L. getula* 26, *L. getula* 3, *L. getula* 23, *L. getula*

21, *L. getula* 14, *L. getula* 5, *L. getula* 15, *L. getula* 1, *L. getula* 2, *L. getula* 25, *L. getula* 9 (Tabla 1). Según el tamaño que mostraron los fragmentos amplificados en los geles de agarosa (entre 150 y 350 pares de bases), los 13 marcadores fueron agrupados en dos reacciones multiplex (reacciones donde se amplifican varios microsatélites paralelamente) que incluían 7 y 6 *loci*, respectivamente. Se marcó cada cebador directo con una fluorescencia (Tabla 1) que permitiese su visualización en el secuenciador ABI 3500. Existen cuatro fluorescencias diferentes: 6-FAM, de color azul; PET, de color rojo; VIC, de color verde y NED, de color amarillo. La combinación adecuada de estas fluorescencias permite visualizar hasta 4 fragmentos de igual tamaño en una misma corrida del secuenciador.

4. Protocolo de toma de muestras y análisis genético

4.1 ANÁLISIS DE LABORATORIO

Se analizó un total de 60 ejemplares de culebra real de California, 30 pertenecientes al núcleo principal de Telde y 30 pertenecientes al núcleo secundario de Gáldar (Figura 2). Para la extracción del ADN genómico de las muestras se empleó dos kits comerciales: DNeasyBlood & Tissue Kit (QIAGEN®) y EZNA Tissue kit (Omega Bio-Tek ®). Se utilizó alrededor de 25 mg de cada muestra y se realizó una digestión con proteinasa K a 55-56 °C durante 24 h. A continuación, y siguiendo el protocolo de cada kit, se realizó una serie de lavados utilizando varias soluciones que se encargan de la purificación del ADN que queda retenido en una columna. Finalmente, el ADN aislado se disolvió en 200 µL de agua. La cuantificación de ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop®ND-1000 o un fluorímetro Qubit®. Posteriormente, todas las muestras de ADN extraídas fueron diluidas a una concentración de 20 ng/µL.

Tabla 1. Marcadores microsatélite seleccionados para su amplificación en las muestras de *Lampropeltis getula californiae* de los núcleos de Gáldar y Telde. Se muestra la fluorescencia utilizada en el cebador directo para la amplificación de cada *locus*, 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.

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

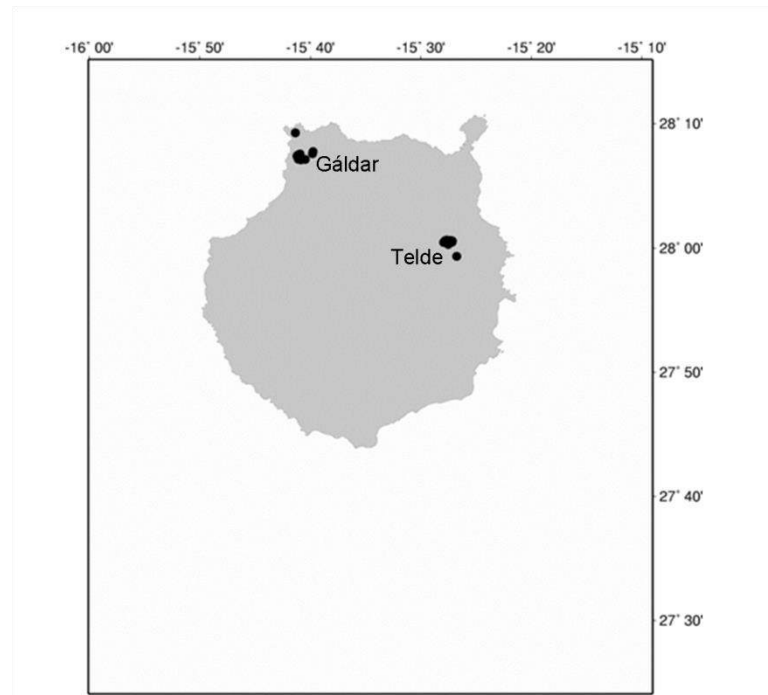


Figura 2. Localización de las muestras de culebra real de California analizadas en este estudio. Mapa creado con Maptool (www.seaturtle.org).

Se amplificó mediante PCR 13 microsatélites tri- y tetranucleótidos. Las PCR se realizaron en dos reacciones multiplex de 7 y 6 marcadores y 14 y 11 μ L, respectivamente (Tabla 1). Se utilizó el kit Platinum® Multiplex PCR Master Mix que permite la amplificación simultánea de varios *loci* y en cada reacción se añadió 3 μ L del ADN extraído (~60 ng). La concentración de los cebadores fue de 1 μ M para los *loci* *L. getula* 6, *L. getula* 3, *L. getula* 23 y *L. getula* 14, de 2 μ M 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 μ M 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 1:10 y fueron analizados en un secuenciador ABI3500 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) (Figura 3).

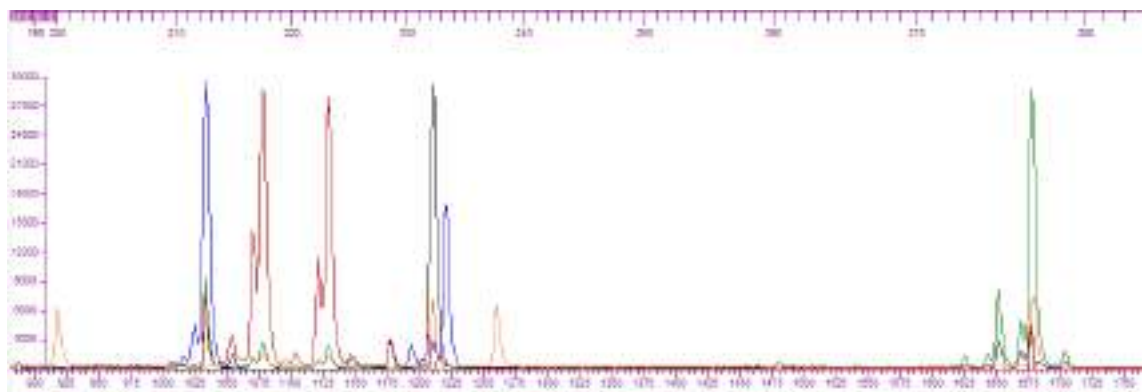


Figura 3. Genotipos de 4 marcadores microsatélite amplificados en un individuo de *Lampropeltis getula californiae* de la población de Telde. Cada color se corresponde con un *locus* diferente.

4.2 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se utilizó el programa Micro-Checker 2.2.3 para detectar errores de genotipado. Se evaluó la existencia de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) para cada localidad y cada *locus* utilizando el programa Genepop 3.4 (Rousset 2008). Así mismo, se analizó el desequilibrio de ligamiento de cada par de *loci* para confirmar la independencia de los microsatélites seleccionados. Los valores significativos fueron ajustados mediante la corrección secuencial de Bonferroni. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el programa GeneAlex 6.5 (Peakall y Smouse 2006). Los niveles de diversidad genética intrapoblacional fueron evaluados considerando: número de alelos (*K*), riqueza alélica (*AR*) basada en 24 individuos diploides (FSTAT 2.9.3; Goudet 1995), alelos privados (*PA*; GeneAlex 6.5),

heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada no sesgada (H_e) (Genetix 4.0). Se determinó el coeficiente de parentesco de los individuos dentro de cada una de las dos poblaciones utilizando el estimador de Ritland (R_R ; Ritland 1996) y el estimador de Queller y Goodnight (R_{QG} ; Queller y Goodnight 1989) usando el programa GenAlex 6.5. Se determinó la existencia de diferencias en diversidad, parentesco y valores F_{IS} (índice de consanguinidad intrapoblacional) 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.

Para investigar los posibles cambios demográficos asociados con la introducción de la culebra real de California en las dos localidades 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). La significancia del valor 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 significancia del 0,05 (Reich et al. 1999).

Finalmente, se determinó el tamaño efectivo poblacional (N_e) de la culebra real de California en ambas localidades mediante dos aproximaciones diferentes, Colony 2.0 (Jones y Wang 2010) que estima N_e a partir de las asignaciones de hermandad usando un método de probabilidad completa y apareamiento aleatorio, y NeEstimator basado en el desequilibrio de ligamiento (Hill 1981; Peel et al. 2004).

5. Resultados

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

En ninguna de las dos localidades se encontró errores de genotipado debido a la falta de amplificación de uno de los dos alelos (Allele Dropout) o a errores en la denominación de los alelos (Scoring Error). Varios microsatélites mostraron un número de homocigotos superior al esperado, aunque los marcadores con exceso de homocigosidad no fueron consistentes en las dos poblaciones, es decir, los microsatélites con exceso de homocigotos identificados en cada población fueron diferentes. El alto número de *loci* con exceso de homocigotos (Gáldar, $n = 7$; Telde, $n = 6$; Tabla 2) podría sugerir la existencia de alelos nulos, es decir, falta de un alelo debido a sustituciones, deleciones e inserciones en las secuencias que corresponden a los sitios de unión de los cebadores; sin embargo, el origen de las dos poblaciones a partir de unos pocos individuos hace pensar que este resultado refleja la elevada tasa de endogamia existente en los dos núcleos de culebra real de California en la isla de Gran Canaria.

En Gáldar, siete marcadores se desviaron significativamente del equilibrio de HW tras la corrección secuencial de Bonferroni (*loci* *L. getula* 1, *L. getula* 6, *L. getula* 3, *L. getula* 14, *L. getula* 15, *L. getula* 21, *L. getula* 23), mientras que en Telde, seis *loci* mostraron desviaciones significativas (*loci* *L. getula* 1, *L. getula* 5, *L. getula* 6, *L. getula* 25, *L. getula* 26, *L. getula* 23) indicando una falta de equilibrio genético de las poblaciones. El análisis de equilibrio de ligamiento, que estudia la segregación independiente de alelos de genes diferentes, fue significativo solamente en 13 de las 156 comparaciones a pares (entre *loci* y considerando las dos poblaciones). Además, las comparaciones a pares significativas no fueron consistentes en las dos poblaciones analizadas, señalando la independencia de los microsatélites estudiados. Basándose en estos resultados, se procedió a realizar el resto de análisis con el total de los marcadores analizados.

ACTION A.4 Análisis genético de los ejemplares capturados en el periodo 2007-2010

Tabla 2. Resultados del análisis de errores de genotipado (MicroChecker). Para cada *locus* se muestra la existencia de error en la denominación de alelos (Scoring Errors, SE), error debido a la falta de amplificación de uno de los dos alelos (Allele Dropout, AD) y un exceso de homocigotos compatible con la existencia de alelos nulos (Null Alleles, NA). La elevada homocigosidad detectada para varios marcadores en ambas poblaciones podría estar relacionada con la alta tasa de endogamia de la población.

<i>Locus</i>	Gáldar			Telde		
	SE	AD	NA	SE	AD	NA
<i>L. getula 1</i>	-	-	x	-	-	x
<i>L. getula 2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. getula 5</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. getula 6</i>	-	-	x	-	-	x
<i>L. getula 16</i>	-	-	-	-	-	x
<i>L. getula 25</i>	-	-	x	-	-	-
<i>L. getula 26</i>	-	-	-	-	-	x
<i>L. getula 3</i>	-	-	x	-	-	-
<i>L. getula 9</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. getula 14</i>	-	-	x	-	-	-
<i>L. getula 15</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. getula 21</i>	-	-	x	-	-	x
<i>L. getula 23</i>	-	-	x	-	-	x

5.2 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE GÁLDAR Y TELDE

El análisis de componentes principales (ACP) utilizando los genotipos de los individuos reveló tres grupos (Figura 4), dos pertenecientes al núcleo de Telde (grupos A y B) y uno perteneciente al de Gáldar (grupo C). La existencia de estos grupos implica un aislamiento reproductivo entre los mismos. Este resultado es esperado entre los núcleos de Gáldar y Telde, donde la distancia geográfica puede actuar como una barrera al flujo génico, produciendo el aislamiento reproductivo de los dos grupos. Sin embargo, la existencia de dos grupos genéticamente diferenciados dentro del núcleo de Telde (grupos A y B) resultó inesperado. Los individuos de ambos grupos no presentan diferencias en su localización, por lo que podemos descartar que el aislamiento sea

geográfico (como, por ejemplo, que los individuos del grupo B se encuentren en un barranco aislados de los individuos del grupo A) (Figura 5).

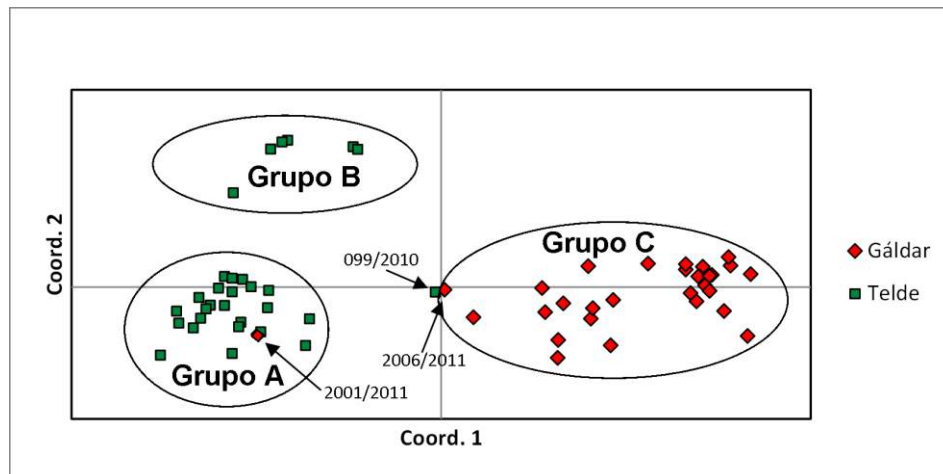


Figura 4. Análisis de componentes principales con los resultados de 13 marcadores microsatélite genotipados en 60 individuos de los núcleos de Telde ($n = 30$) y Gáldar ($n = 30$). Las flechas señalan los ejemplares con identificación 2001/2011, 2006/2011 y 099/2010.

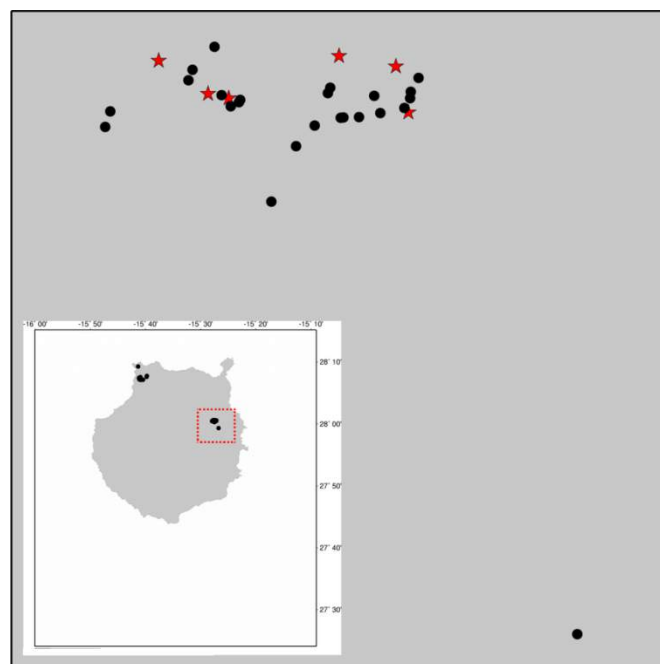


Figura 5. Mapa con las localizaciones de los individuos genéticamente caracterizados en el núcleo de Telde. El cuadro rojo muestra la situación del núcleo de Telde en la isla de Gran Canaria. En la zona ampliada se muestra las localizaciones de captura de los individuos de Telde. Los puntos señalan individuos pertenecientes al grupo A, mientras que las estrellas rojas señalan individuos pertenecientes al grupo B.

Todos los individuos del grupo B fueron albinos (cinco albinos lineales y un albino anillado), mientras que el albinismo resultó ser menos abundante en el resto de individuos de Telde (grupo A; Figura 6). Una selección en el momento de la reproducción basada en el patrón de los individuos (normal o albino) podría explicar el aislamiento genético encontrado en los dos grupos de Telde.

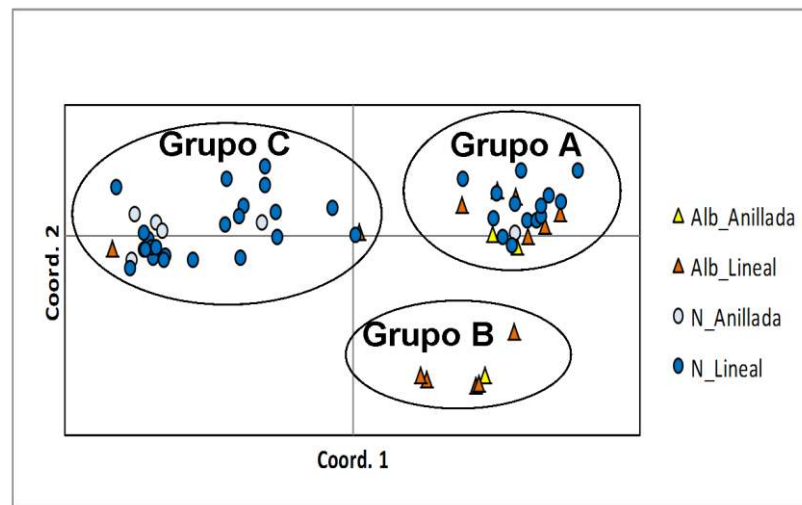


Figura 6. Análisis de componentes principales de los genotipos para 13 marcadores microsatélite y el patrón de coloración de cada individuo analizado. Abreviaturas: Alb_Anillada: albina anillada, Alb_Lineal: albina lineal, N_Anillada: normal anillada, N_Lineal: normal lineal.

Ambos núcleos presentaron valores de heterocigosidad similares (Gáldar H_o = 0,490; Telde H_o = 0,485; p = 0,329; Tabla 3). Estos valores se mantuvieron al excluir el grupo pequeño (grupo B) de serpientes de Telde de esta localidad (Telde* H_o = 0,480; Tabla 3). Gáldar presentó una riqueza alélica (AR) superior a la de Telde (Gáldar AR = 6,364, IC 95% = 0,900; Telde AR = 4,875, IC 95% = 0,775). Las diferencias en AR se hicieron más notables cuando se excluyó de los análisis los individuos del grupo B (Telde* AR = 4,101, IC 95% = 0,509; Figura 7); aunque estas diferencias no resultaron significativas (p = 0,163). Gáldar presentó un número de alelos privados (PA, alelos exclusivos de una población) mayor que Telde (Gáldar media PA = 3,538, IC 95% = 0,931; Telde media PA = 0,846, IC 95% = 0,764; Tabla 3).

El valor medio de coeficiente de parentesco de ambos núcleos fue superior del esperado al azar, aunque sin diferencias significativas entre ambas localidades (Gáldar $R_R = 0,024$, $R_{QG} = 0,109$; Telde $R_R = 0,060$; $R_{QG} = 0,237$; $p = 0,329$; Figura 8A). Cuando se analizó por separado los individuos del grupo B, se comprobó el alto grado de parentesco que presentaban los individuos entre sí ($R_R = 0,356$; $R_{QG} = 0,529$; Figura 8B), siendo probable su procedencia a partir de una misma pareja reproductora. Sin embargo, estos individuos unidos al resto de ejemplares analizados en Telde ($R_R = 0,054$; $R_{QG} = 0,246$; Figura 8B) contribuyen a disminuir el coeficiente de parentesco global de esta localidad. El coeficiente de parentesco es una medida del parentesco existente entre dos individuos y representa la probabilidad de que dos genes, tomados aleatoriamente de cada individuo, sean idénticos. Aunque las diferencias no fueron significativas, los individuos de la población de Gáldar presentaron un índice de parentesco menor que los de Telde. Este resultado podría estar relacionado con el grado de dispersión que muestran los individuos en ambos núcleos: El núcleo de Gáldar se caracteriza por presentar menos recursos alimenticios para la culebra real de California que el núcleo de Telde; esto origina que los individuos de Gáldar se vean obligados a dispersarse en busca de recursos, disminuyendo así la probabilidad de entrecruzamiento con un individuo emparentado.

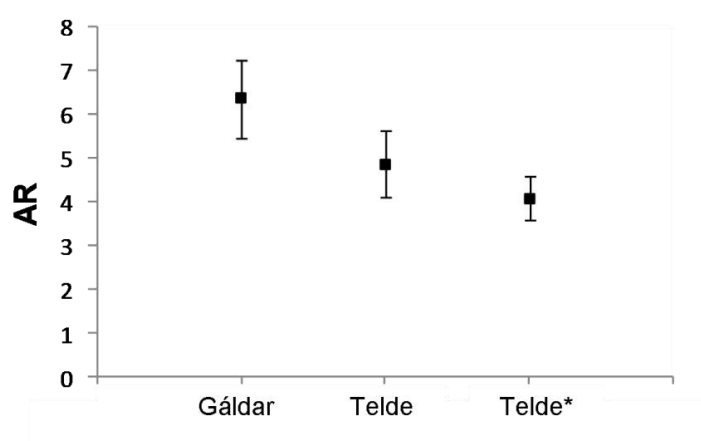
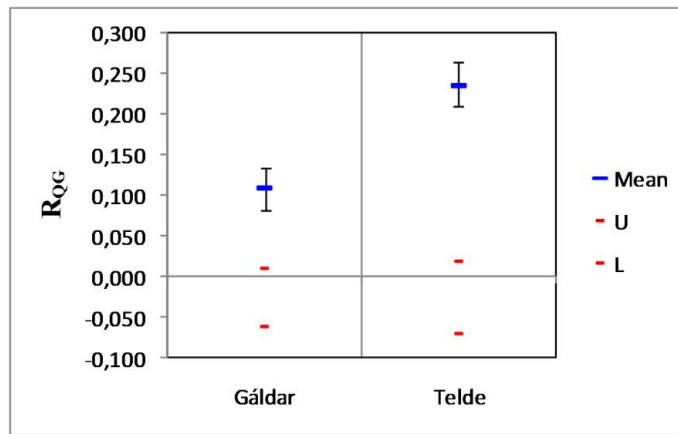


Figura 7. Riqueza alélica (media e intervalo de confianza al 95%) de los núcleos de Gáldar y Telde. Telde* representa el núcleo de Telde excluyendo los individuos del grupo B.

(A)



(B)

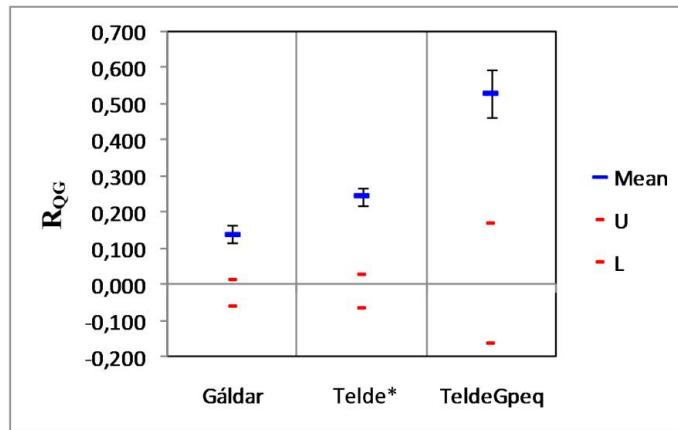


Figura 8. Coeficiente de parentesco (media y desviación estándar; Queller and Goodnight 1989) de (A) las poblaciones de Gáldar y Telde y (B) los tres grupos identificados en el ACP (Figura 4). Telde* representa los individuos pertenecientes al grupo A del ACP. TeldeGpeq representa los individuos del grupo B del ACP. U y L muestran los límites superior e inferior de la desviación estándar de los valores esperados al azar.

El coeficiente de consanguinidad o endogamia (F_{IS}) fue similar en ambas localidades (Gáldar F_{IS} = 0,257; Telde F_{IS} = 0,245; p = 0,329; Tabla 3). Tras excluir el grupo B de Telde, los núcleos de Telde y Gáldar siguieron sin mostrar diferencias significativas (p = 0,329). El coeficiente de endogamia es el coeficiente de parentesco entre los padres de un individuo y mide la probabilidad de que dos alelos de un gen en un mismo individuo sean idénticos por descendencia, siendo cero si no existe endogamia. Las elevadas tasas de endogamia encontradas en los tres grupos identificados en el ACP (Tabla 3) destacan un origen a partir de un número reducido de reproductores.

Tabla 3. Índices de diversidad encontrados en los núcleos de Gáldar y Telde. Telde* representa los individuos analizados en Telde excluyendo los ejemplares pertenecientes al grupo B identificado en el ACP (Figura 4). H_o , heterocigosidad observada; H_e , heterocigosidad esperada; K , número de alelos observado; AR , riqueza alélica; PA , alelos privados; F_{IS} , coeficiente de endogamia. Se muestra la media, desviación estándar (ds) y el intervalo de confianza al 95%.

<i>Locus</i>	H_o			H_e			K			AR			PA			F_{IS}		
	Gáldar	Telde	Telde*	Gáldar	Telde	Telde*	Gáldar	Telde	Telde*	Gáldar	Telde	Telde*	Gáldar	Telde	Telde*	Gáldar	Telde	Telde*
1	0,500	0,500	0,667	0,764	0,680	0,572	7,000	7,000	6,000	6,724	6,525	5,823	3	2	0	0,346	0,265	0,198
2	0,750	0,433	0,500	0,785	0,611	0,628	8,000	5,000	5,000	7,553	4,919	4,989	4	1	0	0,045	0,291	0,336
5	0,800	0,633	0,167	0,799	0,782	0,702	9,000	7,000	5,000	8,356	6,563	4,911	6	2	2	-0,001	0,190	-0,068
6	0,379	0,633	1,000	0,584	0,795	0,695	6,000	8,000	4,000	5,773	7,719	3,995	4	2	4	0,350	0,204	0,220
16	0,500	0,433	0,667	0,604	0,660	0,491	6,000	6,000	3,000	5,569	5,794	3,000	4	1	3	0,173	0,344	0,236
25	0,444	0,433	0,167	0,645	0,583	0,472	4,000	4,000	4,000	3,999	3,998	3,911	1	0	0	0,310	0,256	-0,060
26	0,483	0,367	0,167	0,480	0,618	0,444	6,000	5,000	3,000	5,628	4,763	2,995	4	1	2	-0,005	0,407	0,061
3	0,464	0,633	0,500	0,646	0,596	0,615	7,000	3,000	3,000	6,678	3,000	3,000	4	0	0	0,281	-0,063	-0,084
9	0,444	0,793	0,833	0,612	0,759	0,774	4,000	5,000	5,000	3,989	4,828	4,957	1	2	0	0,274	-0,045	-0,011
14	0,571	0,400	0,000	0,757	0,474	0,529	10,000	3,000	3,000	9,499	2,963	2,995	7	0	0	0,245	0,155	0,055
15	0,542	0,467	0,500	0,615	0,573	0,588	5,000	4,000	4,000	5,000	3,925	3,989	2	1	0	0,119	0,186	0,220
21	0,417	0,367	0,667	0,680	0,557	0,577	8,000	5,000	5,000	8,000	4,400	4,750	3	0	0	0,387	0,342	0,495
23	0,080	0,214	0,333	0,449	0,612	0,606	6,000	4,000	4,000	5,958	3,982	4,000	3	0	0	0,822	0,650	0,700
media	0,490	0,485	0,480	0,648	0,638	0,592	6,615	5,077	4,154	6,364	4,875	4,101	3,538	0,923	0,846	0,257	0,245	0,177
ds	0,174	0,152	0,130	0,110	0,094	0,095	1,805	1,553	0,987	1,656	1,426	0,936	1,713	0,862	1,405	0,217	0,184	0,234
95% IC	0,095	0,083	0,071	0,060	0,051	0,052	0,981	0,844	0,537	0,900	0,775	0,509	0,931	0,469	0,764	0,118	0,100	0,127

5.3 DISTANCIA GENÉTICA, EFECTO FUNDADOR DE LAS POBLACIONES Y CAMBIOS DEMOGRÁFICOS

Los núcleos de Telde y Gáldar presentaron una diferenciación genética significativa ($F_{ST} = 0,184$, $p < 0,001$). El grupo B de Telde, identificado con el ACP, mostró una diferenciación genética similar respecto al grupo A de Telde ($F_{ST} = 0,354$, $p < 0,001$) y al grupo C perteneciente al núcleo de Gáldar ($F_{ST} = 0,358$, $p < 0,001$). La existencia de dos grupos claramente diferenciados en el núcleo de Telde sugiere, o bien la existencia de dos eventos de introducción, o bien una única introducción pero utilizando dos stocks genéticos diferentes en esta localidad. El núcleo de Gáldar presentó una distancia genética inferior con el grupo A de Telde ($F_{ST} = 0,207$, $p < 0,001$) que con el grupo B, señalando un vínculo entre estos dos núcleos. La fuerte deriva genética, es decir las fluctuaciones aleatorias en las frecuencias alélicas de una generación, producida como consecuencia del efecto fundador de la población habría producido el cambio de las frecuencias génicas en las dos poblaciones (Anexo I) y por tanto, la diferenciación genética de las mismas.

Basándose en los genotipos de los ejemplares analizados, un individuo capturado en Gáldar (Identificación: 2006/2011) se situó en el ACP muy próximo al grupo A de Telde (Figura 4) y presentó valores de asignación muy similares para los dos núcleos (Gáldar: -30,185; Telde: -28,719); mientras que otro ejemplar capturado en Gáldar (Identificación: 2001/2011) se situó en el centro del grupo A (Figura 4) y fue asignado a la población de Telde (Gáldar: -23,094; Telde: -10,361). De forma similar, un individuo captura en Telde (Identificación: 099/2010) se situó muy próximo a los individuos del grupo A (Figura 4) y presentó valores de asignación muy similares para los dos núcleos (Gáldar: -33,140; Telde: -34,793). Estos resultados corroboran el vínculo histórico existente entre el núcleo de Gáldar y el grupo A de Telde. La edad estimada para los ejemplares 2006/2011 y 2001/2011 fue de 13 y 12 años, respectivamente, pudiendo ser estos individuos los colonizadores que dieron lugar a la población. Dada la ausencia de datos ecológicos que indiquen una dispersión efectiva de estas poblaciones, se descarta la posibilidad de que estos dos individuos sean migrantes naturales. No se puede descartar que sean ejemplares recientemente translocados (nuevos eventos de suelta),

sin embargo, se considera que este hecho sería poco probable debido a que la prolongada edad de estos individuos podría corresponderse con el periodo de tiempo transcurrido desde la introducción.

Bajo el modelo de mutación de dos fases (TPM: 90% SMM y 10% IAM), la población de Gáldar mostró una deficiencia de heterocigotos como resultado de un alto número de alelos ($p = 0,005$). El número esperado de *loci* con exceso de heterocigotos ($n = 7,71$) fue substancialmente superior al número observado de *loci* con exceso de heterocigotos ($n = 3$) e inferior al número observado de *loci* con déficit de heterocigotos ($n = 10$). En una población cuyo tamaño efectivo 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 previo a la expansión, llevaría a encontrar un número de *loci* con exceso de heterocigotos significativamente superior. Los resultados de la población de Gáldar indican una expansión poblacional reciente en la historia de la población, que habría sido posterior al cuello de botella sufrido en la introducción. El análisis de la distribución de frecuencias alélicas descartó igualmente un cuello de botella reciente en la población, mostrando una distribución “en forma de L” (Figura 9A; Luikart y Cornuet 1998), es decir que hay una mayor proporción de alelos en frecuencias alélicas bajas (rango 0,001-0,1) que en frecuencias alélicas intermedias. El caso contrario sería el esperado para una población con cuello de botella. Aunque el resultado del G-test no encontró evidencias de expansión ($g\text{-value} = 0,338$), los resultados del test K *intra-locus* sugirieron, de forma similar a los análisis anteriores, un aumento en el tamaño efectivo de la población de Gáldar ($p = 0,037$).

Los resultados del programa Bottleneck, utilizando el modelo de mutación de dos fases (TPM: 90% SMM y 10% IAM), indicaron que el núcleo de Telde es una población estable ($p = 0,946$). El número de *loci* esperado con exceso de heterocigotos ($n = 7,70$) fue similar al número de *loci* observados con exceso de heterocigotos ($n = 8$) y próximo al número de *loci* observado con déficit de heterocigotos ($n = 5$). Así mismo, los resultados del análisis de la distribución de frecuencias alélicas señalaron una distribución “en forma de L” (Figura 9B), descartando la existencia de un cuello de botella reciente en la población de Telde. De forma similar, los análisis K-test y G-test,

que examinan desviaciones del equilibrio de mutación y deriva, descartaron la existencia de una expansión poblacional en el núcleo de Telde.

Es importante tener en cuenta que todos los individuos analizados tanto en la población de Gáldar como en la de Telde fueron adultos (Gáldar: media longitud cuerpo = 109,35 cm, IC 95% = 5,49; Telde: 89,68, IC 95% = 4,60). Los resultados genéticos obtenidos reflejarían episodios históricos de las poblaciones, ocurridos en las generaciones anteriores a las de los individuos analizados. Por ello, no es de extrañar que los datos ecológicos de la población de Gáldar no se correspondan con los resultados genéticos obtenidos. Sería necesario analizar las próximas generaciones para detectar genéticamente cambios demográficos que se están produciendo en la actualidad.

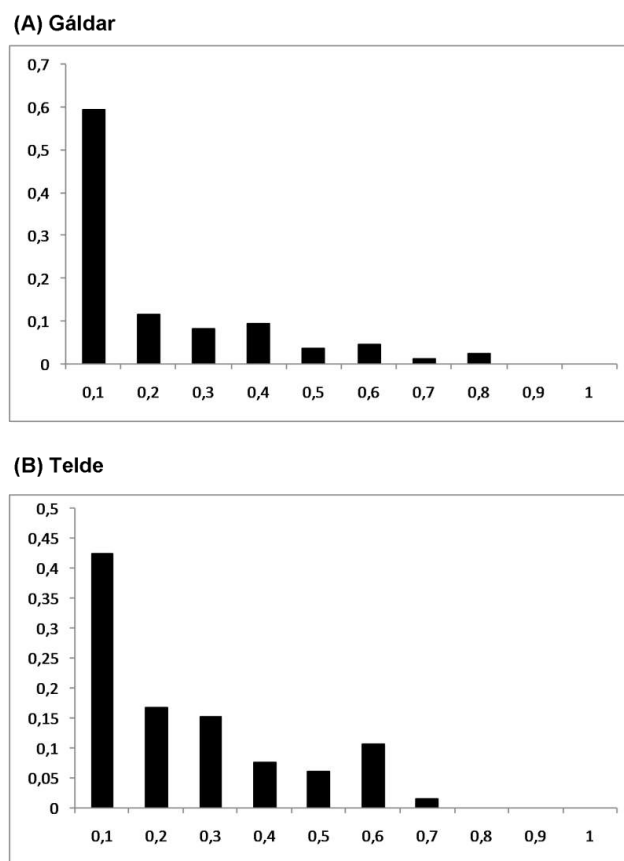


Figura 9. Distribución de frecuencias alélicas de todos los microsatélites analizados en las poblaciones de culebra real de California de la isla de Gran Canaria. Se observa una distribución “en forma de L” para los núcleos de Gáldar y Telde. Los valores a lo largo del eje X representan el valor máximo para cada clase de frecuencia de los alelos (la primera clase representa alelos con frecuencias entre 0 y 0,1; la segunda, entre 0,1 y 0,2; etc.)

5.4 TAMAÑO EFECTIVO DE LAS POBLACIONES DE GÁLDAR Y TELDE

El tamaño efectivo poblacional (N_e) se define como el tamaño de la población ideal (N) que resultará en la misma cantidad de deriva génica, endogamia o pérdida de heterocigosis que la población actualmente considerada (Hartl y Clark 1997). Generalmente, N_e es menor que el tamaño de la población. El programa Colony, que estima N_e a partir del análisis de parentesco, estimó valores superiores a los estimados con el programa Ne Estimator, que determina el tamaño efectivo poblacional a partir del método de desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, ambos métodos fueron consistentes en determinar valores de N_e pequeños ($N_e < 50$; Tabla 4) y superiores en el caso de la población de Gáldar. Este resultado contrasta con los datos de abundancia recogidos en el campo y podría ser consecuencia de la mayor diversidad genética que presenta la población de Gáldar. Además, el menor índice de parentesco entre los individuos de esta población podría afectar de igual forma a la hora de estimar el N_e de la misma.

Tabla 4. Tamaño efectivo poblacional (N_e) de los núcleos de Telde y Gáldar estimados con los programas Ne Estimator y Colony. Se muestra la media y el intervalo de confianza al 95%.

	N_e Estimator (Linkage Disequilibrium)	Colony (Full Likelihood)
Gáldar	12,8 (11,4, 14,5)	47 (28, 83)
Telde	7,8 (6,9, 8,7)	29 (17, 53)

6. Conclusiones

Los resultados del análisis genético de 60 individuos de culebra real de California de los núcleos de Telde y Gáldar con 13 microsatélites, nos han permitido determinar la variabilidad genética así como el grado de aislamiento existente entre ambas poblaciones. A pesar de que las dos poblaciones presentaron una diversidad genética

limitada, propia de poblaciones constituidas a partir de pocos individuos, la población de Gáldar presentó una diversidad genética superior a la de Telde (Tabla 3). Aunque la población de Gáldar parece estar en un ambiente poco propicio para su crecimiento debido a la falta de recursos, se recomienda el control de su dispersión hacia otras zonas que pudiesen resultar óptimas, ya que, genéticamente, su mayor variabilidad podría resultarle ventajosa en la colonización de otras áreas. Ambos núcleos presentaron un déficit de heterocigotos significativo, ligado posiblemente al alto nivel de endogamia de las dos poblaciones (Gáldar $F_{IS} = 0,257$; Telde $F_{IS} = 0,245$). Este resultado estaría relacionado con la fundación de las poblaciones a partir de muy pocos individuos, lo que daría lugar a poblaciones formadas por individuos con un alto índice de parentesco (Figura 8A). Debido a las características del ambiente, los individuos pertenecientes a la localidad de Gáldar se ven obligados a una mayor dispersión respecto a los de Telde para la búsqueda de recursos. Este hecho originaría que, pese a tener niveles de endogamia similares, el índice de parentesco en la localidad de Gáldar sea inferior al de Telde (Figura 8B). La alta tasa de endogamia y la reducida variabilidad genética limitan las posibilidades de adaptación ante posibles cambios y/o presiones selectivas (Crawford y Whitney 2010), lo que representa una ventaja para el control de la culebra real de California en la isla de Gran Canaria.

El ACP reveló la existencia de tres grupos genéticamente diferentes (Figura 4). Los dos grupos presentes en la localidad de Telde presentaron una alta diferenciación genética ($F_{ST} = 0,354$), indicando la existencia de dos eventos de introducción temporales o bien al mismo tiempo pero utilizando *stocks* diferentes. El aislamiento reproductivo que existe entre los dos grupos presentes en la localidad de Telde (grupos A y B) no se debe a un aislamiento geográfico. Los reducidos niveles de diversidad presentes en el grupo B así como la coloración albina de la totalidad de sus individuos sugieren un mismo origen, probablemente a partir de una misma pareja reproductora para todos. Se necesitan estudios adicionales para determinar la causa del aislamiento reproductivo entre los dos grupos de Telde. Gáldar presentó una distancia genética inferior con el grupo A de Telde ($F_{ST} = 0,207$), señalando un vínculo entre la población de Gáldar y este grupo de individuos de Telde. La deriva genética producida como consecuencia de un cuello de botella durante la introducción (efecto fundador) podría

haber producido cambio en las frecuencias alélicas (Anexo I) que llevaría a la diferenciación significativa de ambos grupos. Este vínculo fue corroborado por los dos individuos muestreados en Gáldar que, basándose en sus genotipos, se agruparon con los individuos del grupo A de Telde. Ambos individuos presentaron una edad avanzada (12 y 13 años), pudiendo estar relacionados con los individuos que originalmente dieron lugar a la población o bien ser resultado de una translocación reciente.

El estudio de cambios demográficos en los dos núcleos señaló una expansión poblacional reciente en la historia de la población de Gáldar mientras que no encontró evidencias de cambios (reducción o aumento del tamaño poblacional) recientes en la historia de la población de Telde. Esta expansión poblacional de Gáldar podría corresponderse a una expansión tras el cuello de botella sufrido después de la introducción y sugeriría un origen más reciente para la población de Gáldar. Es importante tener en cuenta que los individuos utilizados en este estudio se correspondieron con ejemplares adultos y que estos resultados estarían reflejando episodios históricos ocurridos en generaciones anteriores. Se recomienda analizar cambios demográficos en futuras generaciones para evaluar episodios demográficos actuales. Se estimaron tamaños efectivos poblaciones (N_e) pequeños para las dos localidades ($N_e < 50$), aunque el número varió dependiendo del método utilizado. La mayor diversidad genética presente en la población de Gáldar junto con el menor índice de parentesco podría haber afectado a la hora de estimar el tamaño efectivo de este núcleo. El reducido tamaño efectivo de ambas poblaciones sugiere que una medida eficaz de control podría ser intentar capturar el limitado número de individuos adultos que contribuyen a la composición genética de las siguientes generaciones.

7. Recomendaciones finales

Basándose en los resultados genéticos reflejados en el presente informe, se recomienda:

- Controlar la dispersión de la culebra real de California del núcleo de Gáldar, población con una mayor variabilidad genética que le podría resultar ventajosa en la colonización de nuevas áreas.
- Realizar un análisis genético de individuos con una longitud menor de 50 cm (individuos con una edad aproximada de dos años) capturados durante el 2013 y 2014. Este análisis nos permitirá determinar cambios en la variabilidad genética, cambios en las tendencias demográficas así como de los tamaños efectivos de las poblaciones. El presente informe se ha basado en el análisis de ejemplares con una longitud media de 90 cm en Telde y 109 cm en Gáldar, lo que corresponde a individuos de aproximadamente 8-10 años (Patiño 2012). La comparación de los resultados derivados del análisis de juveniles de menos de 50 cm y los presentados en este informe, permitirá evaluar los cambios producidos en unos 6-8 años (correspondientes, al menos, al paso de una generación) y determinar así, el efecto que ha tenido el proyecto LIFE10 NAT/ES/00565 sobre el control de la culebra real de California.

8. Referencias

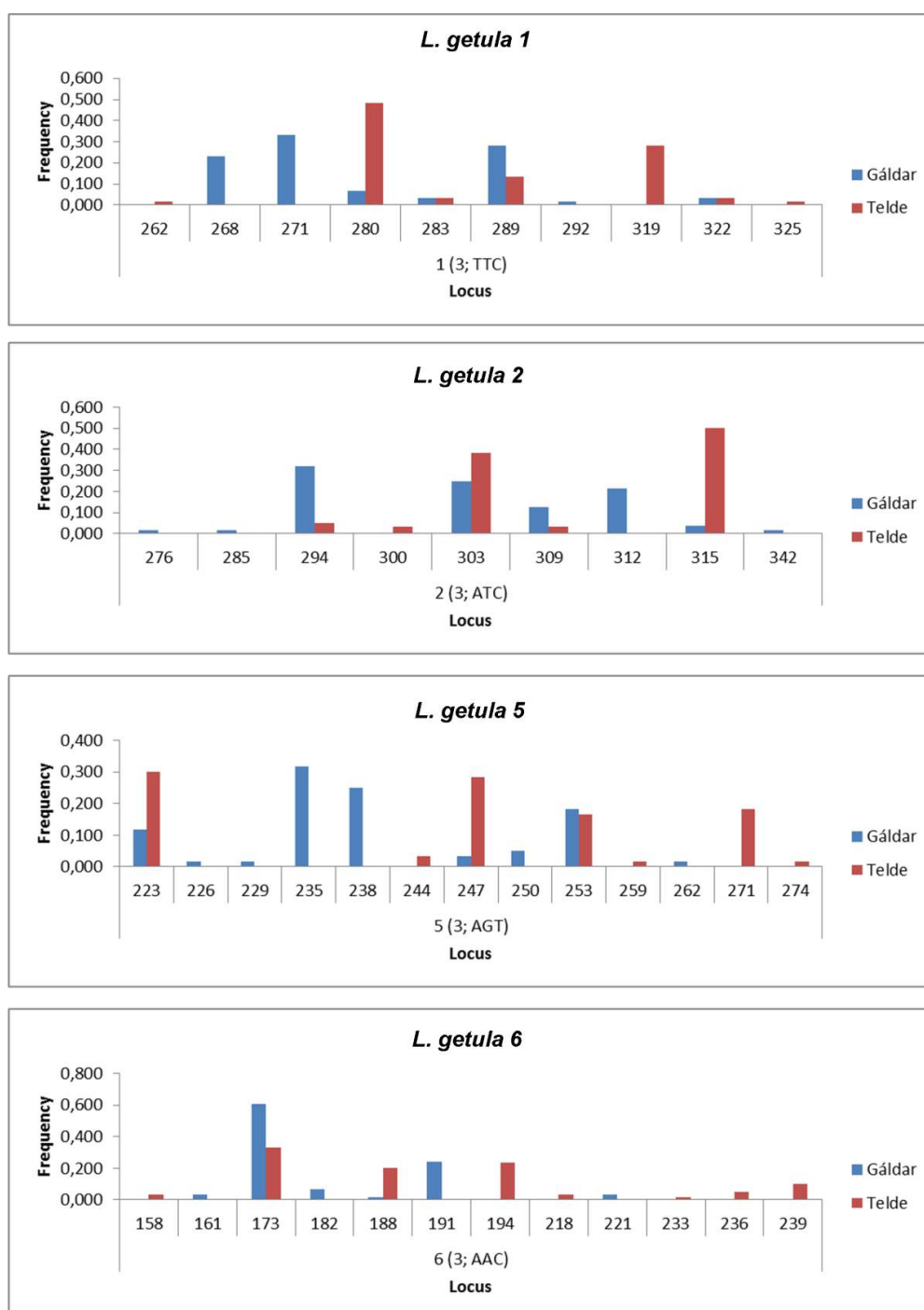
- Bilgin, R. 2007. Kgttests: a simple Excel Macro program to detect signatures of population expansion using microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 7:416-417.
- Bossdorf, O., H. Auge, L. Lafuma, W. E. Rogers, E. Siemann, and D. Prati. 2005. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144:1-11.
- 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.
- Crawford, K. M., K. D. Whitney. 2010. Population genetic diversity influences colonization success. *Molecular Ecology* 19:1253-1263
- 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.
- Hill, W. G. 1981. Estimation of effective population-size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* 38:209-216.
- 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.

- 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., L.F. López-Jurado. 2012. Informe del desarrollo de una librería de microsatélites para la serpiente real de California (*Lampropeltis getula californiae*). Informe año 2012, 11 pp. Proyecto LIFE10 NAT/ES/000565.
- Nei, M., T. Maruyama, R. Chakraborty. 1975. The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. *Evolution* 29:1-10.
- 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
- Peel, D., J. R. Ovenden, S. L. Peel. 2004. NeEstimator: software for estimating effective population size. Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries, Brisbane.
- Queller, D.C., K.F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic-markers. *Evolution* 43: 258-275
- 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.
- Ritland, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and inbreeding coefficients. *Genetic Resources* 67, 175-185.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Sakai, A.K., F.W. Allendorf, J.S. Holt et al. 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 305-332.

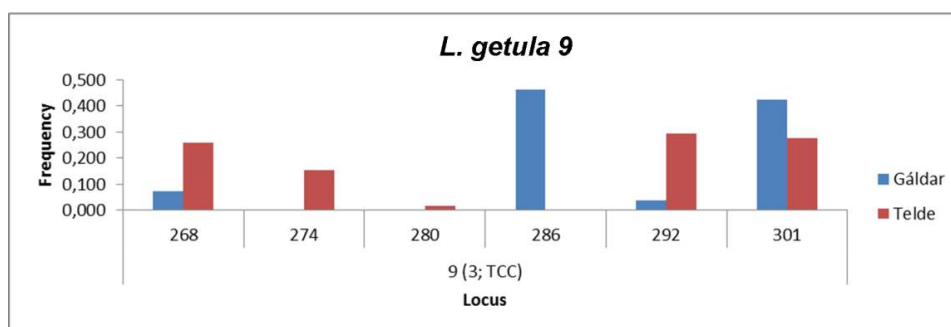
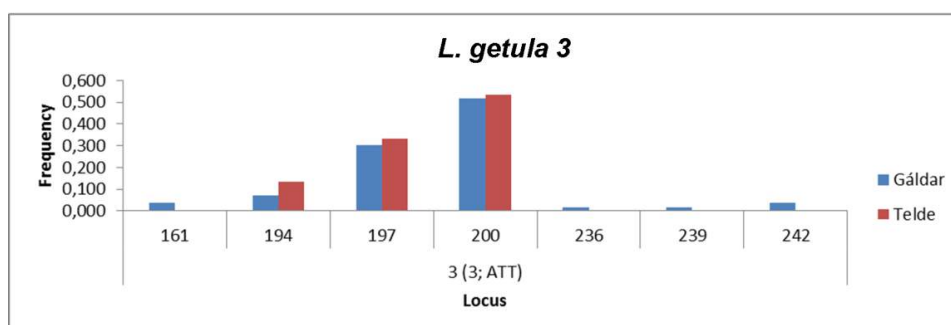
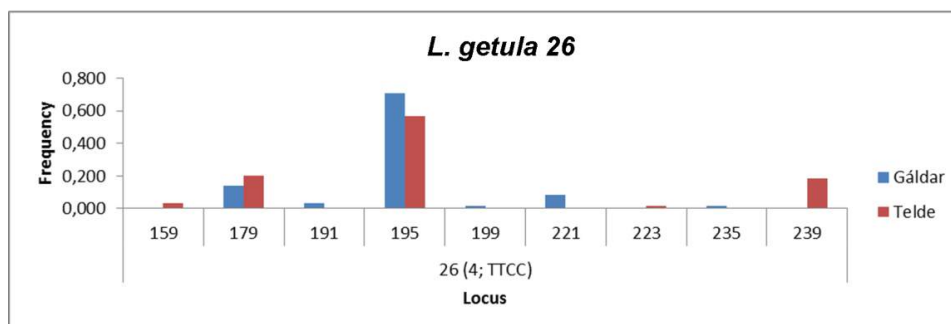
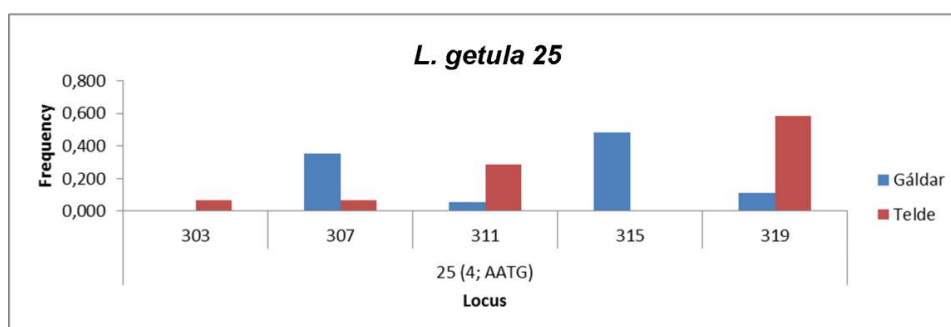
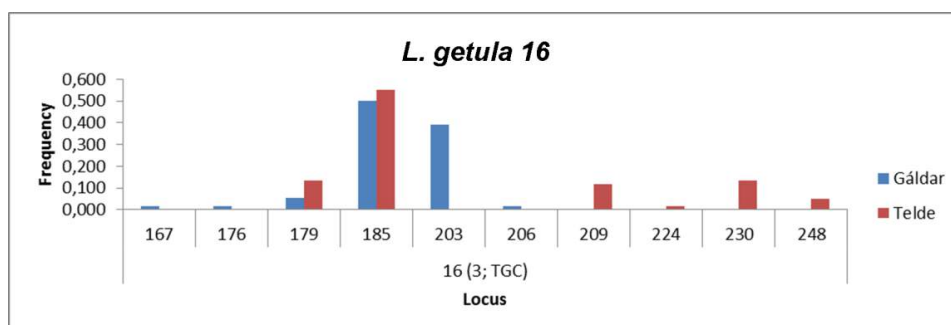
- Shriver, M.D., L. Jin, E. Boerwinkle, R. Deka, R.E. Ferrell, R. Chakraborty. 1995. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Genetics* 12: 914–920.
- Toonen, R.J., S. Hughes S. 2001. Increased throughput for fragment analysis on ABI Prism 377 Automated Sequencer using a membrane comb and STRand Software. *Biotechniques* 31:1320-1324.

ANEXO I

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



 ACTION A.4 Análisis genético de los ejemplares capturados en el periodo 2007-2010



 ACTION A.4 Análisis genético de los ejemplares capturados en el periodo 2007-2010

