

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Filogeografía y origen de *Laterallus spilonotus* (AVES: Rallidae),  
un ave no voladora y endémica de Galápagos**

**Pedro José Martínez Torres**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito

para la obtención del título de:

Ingeniero en Procesos Biotecnológicos.

Quito, 6 de enero de 2020

# UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

## HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**Filogeografía y origen de *Laterallus spilonotus* (AVES: Rallidae),  
un ave no voladora y endémica de Galápagos**

**Pedro José Martínez Torres**

**Calificación**

\_\_\_\_\_

**Nombre del Profesor, Título académico**

María José Pozo, Msc.

**Firma del profesor**

\_\_\_\_\_

Quito, 6 de enero de 2020

### **Derechos de Autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y Apellidos: Pedro José Martínez Torres

Código: 00124781

Cédula de Identidad: 1003662218

Lugar y Fecha: Quito, 6 de enero de 2020

## RESUMEN

Las islas Galápagos han servido como modelo, para comprender procesos evolutivos y ecológicos que actúan sobre especies aisladas. Sin embargo, no todas las especies han recibido la misma atención por parte de la comunidad científica. La polluela de Galápagos (*Laterallus spilonotus*) es un buen ejemplo de esto, pues existe información limitada sobre ella. Esta ave pertenece a la familia Rallidae y es la única especie de esta familia, endémica de Galápagos. Está distribuida en 7 islas del archipiélago, aunque actualmente su presencia se ha reducido a las zonas altas y húmedas de ciertas. No se conoce nada acerca de la diversidad genética de sus poblaciones o las relaciones filogenéticas con otras especies de rálidos. Este estudio presenta por primera vez, datos genéticos que contribuyen a llenar algunos de estos vacíos. Se emplearon marcadores moleculares mitocondriales (CytB – ND2) y nucleares (RAG-1), para determinar la diversidad genética de la población de esta especie en Galápagos. Por otro lado, el secuenciamiento del genoma mitocondrial obtenido por secuenciamiento de segunda generación (Next Generation Sequencing-NGS) sugiere que la especie hermana a *L. spilonotus* es *L. jamaicensis* del continente, y cuya divergencia se dio antes incluso de la formación de las actuales islas. Se sugiere que los datos presentados por este estudio, aparte de aclarar las relaciones filogenéticas de esta especie dentro de los rálidos, también puede ser usada como línea base para el desarrollo de programas de conservación que busquen incrementar la diversidad genética de *L. spilonotus* en las islas Galápagos.

**Palabras clave:** *L. spilonotus*, Galápagos, mitogenoma, filogenia, conservación, aves, Rallidae.

## ABSTRACT

The Galapagos islands has been used as a model to understand evolutionary and ecological process in isolated species. However, not all of Galapagos' species have received the same attention by the scientific community. The Galapagos Rail (*L. spilonotus*) is an example of that affirmation because there is not much information about this specie. This bird bellows to the Rallidae family and is the only specie of this family which is endemic of Galapagos. It inhabits 7 islands of the archipelago, although nowadays its habitat is restricted to the highlands of that islands, which are characterized by has a moisture zone. Nothing is known about its genetic diversity or its phylogenetic relations with other rails. This study presents for very first time, genetic information intends to fulfill the lack of knowledge of this bird. We use mitochondrial (CytB – ND2) and nuclear (RAG-1) markers to determine the genetic diversity of *L. spilonotus* population's in Galapagos. In the other hand, by using Next Generation Sequencing (NGS) it was determined *L. jamaicensis* as sister specie of *L. spilonotus*, and it appears that the divergence toke place before the formation of the extant islands in Galapagos. We suggest that the data presented here, clarify phylogenetic relations between this specie and other rails, also it can be used as a basic biology study to develop conservation programs of *L. spilonotus* in Galapagos

**Key words:** *L. spilonotus*, Galapagos, mitochondrial genome, phylogeny, conservation, birds, Rallidae.

**Tabla de contenido**

1	Introducción .....	10
2	Objetivos .....	13
2.1	Objetivo general.....	13
2.2	Objetivos específicos. ....	13
3	Metodología .....	13
3.1	Área de estudio. ....	13
3.2	Colección y extracción de ADN. ....	14
3.3	Amplificación, secuenciamiento y alineación de ADN mitocondrial y ADN nuclear.....	15
3.4	Análisis molecular. ....	16
3.5	Análisis Filogenéticos.....	16
4	Resultados .....	18
4.1	Diversidad genética de genes mitocondriales y del gen RAG-1.....	18
4.2	Análisis filogenético. ....	19
5	Discusión.....	20
5.1	Diversidad genética de <i>Laterallus spilonotus</i> .....	20
5.2	Análisis filogenético y tiempo de colonización.....	22

6	Conclusiones y recomendaciones.....	24
7	Tablas .....	25
8	Figuras .....	29
9	Referencias .....	33

**Índice de tablas.**

Tabla 1.-Primers empleados para la secuenciación y PCR .....	25
Tabla 2. Estimaciones genéticas basadas en CytB. ....	26
Tabla 3. Estimaciones genéticas basadas en ND2. ....	27
Tabla 4. Estimaciones genéticas basadas en RAG-1.....	28

**Índice de figuras**

<b>Figura 1.</b> Trampa de captura empleando malla de gallinero. ....	29
<b>Figura 2.</b> Individuos capturados en Isabela. ....	29
<b>Figura 3.-</b> Redes de haplotipos. ....	30
<b>Figura 4.-</b> Árbol filogenético. ....	31
<b>Figura 5.-</b> Árbol filogenético. ....	32

## 1 **Introducción**

El archipiélago de las Galápagos es un grupo de islas de origen volcánico situado a 960 km al este de la costa de Ecuador, conformado por 13 islas mayores (área superior a 10 km<sup>2</sup>), 5 islas menores (con un área entre 1-5 km<sup>2</sup>) y varios islotes y rocas (Hedrick, 2019). Las Galápagos son ampliamente reconocidas tras la visita de Charles Darwin al archipiélago en 1835 donde el británico desarrolló su teoría sobre el origen de las especies por selección natural (Geist et. al., 2014). Gracias a este trabajo y a las condiciones naturales de las islas, la comunidad científica ha tenido un amplio interés en las especies que habitan en ellas, para explicar los mecanismos evolutivos que actúan en estas especies.

Se ha reportado que en este archipiélago existen 119 especies de vertebrados, entre mamíferos, reptiles y aves. Este último grupo está compuesto por 57 taxones (entre especies marinas y terrestres), de los cuales 45 se consideran endémicos (Sari & Parker, 2012). El grupo de las aves terrestres es uno de los más estudiados en las islas, con especies icónicas como los pinzones Darwin y cucuves de Galápagos entre las más estudiadas (Grant, 2003; Sato et. al., 2001; Lamichhaney et. al., 2015; De León et. al., 2019, entre otros). Por otro lado, hay especies que no han sido enfoque amplio de estudio de las cuales tenemos conocimiento básico sobre su ecología y evolución como es el caso del atrapamoscas de Galápagos, *Myiarchus magnirostris* (Sari & Parker, 2012); el canario María, *Dendroica petechia aureola* (Chaves et. al., 2012); el gavián de Galápagos, *Buteo galapagoensis* (Bollmer et. al., 2006). En particular, una especie de la cual se tiene escasa información es la polluela de Galápagos (*Laterallus spilonotus*)

*L. spilonotus* es una especie endémica de Galápagos, perteneciente a la familia Rallidae. Esta ave se caracteriza por su pequeño tamaño (entre 15 a 16 cm de longitud y 23 a 24 cm de envergadura), tiene una coloración gris oscura en la cabeza, cuello y pecho, mezclada con un color chocolate oscuro en las partes superiores, con manchas blancas desde el manto hasta las plumas coberteras superiores de la cola (ver Figura 2) y poseen una pobre capacidad de vuelo (por lo que se las puede considerar no voladoras) (Taylor, 1998).

La distribución de esta especie en varias islas ha sufrido cambios importantes como reportan Franklin et. al. (1979). Estos autores señalan que antiguamente se las encontraba desde la zona de manglar, hasta las zonas altas caracterizadas por su humedad y densa cobertura vegetal. En ese mismo trabajo, Franklin et. al. (1979) indican que esta especie puede encontrarse solo en islas cuya altitud sea superior a los 500 msnm, que corresponde a la zona húmeda caracterizada por la presencia de helechos (principalmente *Pteridium aquilinum*) y vegetación arbustiva nativa como *Miconia robinsoniana* es a partir de donde se genera esta zona húmeda. Según esa afirmación, los autores apuntan que las islas en las que se puede encontrar a *L. spilonotus* son: San Cristóbal, Santa Cruz, Floreana, Isabela, Santiago, Fernandina y Pinta. Gracias al portal virtual eBird (Sullivan et. al., 2009), se tienen datos actualizados de avistamientos de esta ave en Galápagos, que confirman su presencia en todas las islas antes mencionadas.

Esta especie está catalogada como vulnerable en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) (BirdLife International, 2016). La poca información actualizada tanto sobre su estado poblacional como su diversidad genética podrían sugerir una recategorización (Donlan et. al., 2007; Gibbs et. al., 2003). Este último parámetro es de suma importancia en temas de conservación debido a que poblaciones con una diversidad genética baja tienden a

presentar un menor potencial evolutivo que especies con una diversidad alta, poniendo en riesgo su mantención en el tiempo (Sherwin & Moritz, 2000).

Al igual que en otros rálidos, no se han resuelto las relaciones filogenéticas de *L. spilonotus*. Sin embargo, la similitud morfológica de esta especie con *L. jamaicensis* ha hecho que se las relacione taxonómicamente como raza de *L. jamaicensis* (Taylor, 1998) o como especies hermanas (Stervander et. al, 2019). No obstante, hoy en día la filogenética es más comunmente usada en taxonomía, pues brinda resultados objetivos en cuanto a las relaciones evolutivas entre especies (Holt & Jønsson, 2014).

Los genes mitocondriales, son uno de los marcadores moleculares más ampliamente usados en la elaboración de árboles filogenéticos por cuatro razones principales: (1) protocolos desarrollados para el aislamiento de ADN mitocondrial (mtADN), (2) la posibilidad de usar enzimas de restricción para detectar diferencias en los nucleótidos, (3) protocolos establecidos de PCR para estos genes y (4) el hecho de que se pueden usar primers universales para la amplificación del ADN (Patwardhan et. al., 2014). Una de las desventajas del uso de estos marcadores, era que normalmente se analizaban uno o dos genes y a partir de ellos se hacía la reconstrucción del árbol, perdiendon la información que otras partes del genoma mitocondrial aportarían. Gracias a las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), este problema se resolvería, pues ahora se pueden reconstruir filgenias empleando el genoma mitocondrial completo (García-R et. al., 2014b).

En este trabajo se emplean datos genéticos de las poblaciones actuales de *L. spilonotus*, para relizar inferencias acerca de la diversidad genética de la especie en las islas. También se recoge evidencia biogeográfica que permitiría plantear una hipótesis acerca del tiempo de llegada de esta ave al archipiélago y de como ha sido su historia

evolutiva. Además, con esta investigación se pretende aportar con información que contribuya a la conservación de *L. spilonotus* en las islas, así como la generación de nuevas preguntas orientadas hacia el entendimiento de los mecanismos de evolución en rálidos.

## 2 **Objetivos**

### 2.1 **Objetivo general.**

Explorar el origen de *Laterallus spilonotus* en el archipiélago de Galápagos.

### 2.2 **Objetivos específicos.**

- Determinar las relaciones filogenéticas de *L. spilonotus* con otras especies de la familia Rallidae.
- Estimar el tiempo de colonización de *L. spilonotus* a Galápagos.
- Inferir la diversidad genética de *L. spilonotus*, a través del análisis de 4 subpoblaciones en el archipiélago.

## 3 **Metodología**

### 3.1 **Área de estudio.**

Este estudio se realizó en cuatro islas dentro del Parque Nacional Galápagos, ubicada en la provincia de Galápagos: Santa Cruz, Isabela, Pinta y Santiago. Las islas en las que se realizó el muestreo se seleccionaron con base a avistamientos de la especie *Laterallus spilonotus*, reportados por Shriver et. al. (2011), Donlan et. al. (2007) y por Franklin et. al. (1979), además de avistamientos registrados en el portal e-bird de Cornell University (Sullivan et. al., 2009). Los puntos de muestreo se localizaron en las siguientes coordenadas: Santa Cruz (-0.638712, -90.355068); Isabela (-0.837200, -91.100862), (-

0.836592, -91.098679) y (-0.837512, -91.090684); Pinta (0.584438, -90.754095) y Santiago (-0.239484, -90.751426).

Todas las zonas de muestreo tienen una elevación superior a los 500 msnm. Esta elevación genera una “zona húmeda” en las islas, caracterizada por una vegetación tupida que varía de una isla a otra. La flora reportada en Santa Cruz se compone principalmente por helechos (*Pteridium aquilinum*, principalmente) y *Cinchona pubescens* (Shriver et. al., 2011). Por otro lado, en Isabela se puede encontrar una mayor presencia de árboles de guayaba (*Psidium guajava*), así como también de *P. aquilinum*. En Santiago, actualmente se aprecian llanuras ampliamente cubiertas por *P. aquilinum* y pasto.

### **3.2 Colección y extracción de ADN.**

Para la captura de individuos se colocaron redes de niebla a ras de suelo formando una “V” o una “T”, de tal manera que el vértice se contraponga al punto donde se escuchó una respuesta por parte de los individuos. Los puntos exactos de muestreo se determinaron mediante la reproducción de uno de los ‘displays’ de canto, con el fin de identificar la presencia de los individuos. En varias ocasiones, se utilizó el canto o llamado por medio de una grabadora de mano desde el vértice de la red, con el objetivo de atraer a los individuos dentro del área delimitada por las mismas y puedan ser capturados. En otras ocasiones se utilizó la misma formación con malla de gallinero en conjunto con redes de niebla (ver Figura 1).

En total, se capturaron 60 individuos: 15 en Santa Cruz, 16 en Isabela, 9 en Pinta y 20 en Santiago. De estos, 7 fueron pichones (3 en Santa Cruz y 4 en Isabela). Esta especie no reporta un dimorfismo sexual evidente, por lo cual no se pudo cuantificar el número de hembras y de machos capturados. De cada individuo se tomaron de muestras de sangre y datos morfométrico antes de su liberación. Se colectaron los siguientes datos

morfométricos: ancho de pico a la altura de las narinas (AP), alto de pico a la altura de las narinas (HA), largo del pico (LP), largo del tarso (T) y el largo del ala (A), además del peso promedio de cada individuo, mediante un calibrador digital y una balanza electrónica, respectivamente. La extracción de sangre se realizó mediante venopunción en el ala, en el caso de los adultos y en la yugular para los pichones. En este último caso se tomaron muestras de menos de 1 ml, para precautelar la vida de los pichones. Se depositó la sangre recolectada en papel FTA® Whatman®, para su transporte al Laboratorio de Biología Evolutiva de la Universidad San Francisco de Quito, donde fueron procesadas.

### **3.3 Amplificación, secuenciamiento y alineación de ADN mitocondrial y ADN nuclear.**

La extracción de ADN mitocondrial (ADNmt) y nuclear se realizó mediante el kit “DNeasy® Blood & Tissue Kit (250)” (Qiagen, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se midió la cantidad y calidad del ADN de las muestras con Epoch® (Bio Tek, USA). La caracterización de los haplotipos se realizó con base en dos marcadores moleculares correspondientes a genes mitocondriales: citocromo oxidasa subunidad B (CytB), NADH deshidrogenasa 2; y un gen nuclear: gen activador de recombinación 1 (RAG-1). Para la amplificación del CytB (1025 pb) se empleó la pareja de primers L14990 y H16065 utilizando el protocolo de PCR previamente descrito para este marcador molecular (Bonaccorso et al., 2010); L5143 y H6313 para ND2 (1148bp) utilizando el protocolo de PCR previamente descrito para este marcador molecular (Bonaccorso et al., 2010) y R52 y R52 para RAG-1 (379 pb) utilizando el protocolo de PCR previamente descrito para este marcador molecular (Johansson, Parsons, Irestedt, & Ericson, 2001) (ver Tabla 1).

Se comprobó la correcta amplificación de los productos de PCR, mediante un gel de agarosa al 1.5% usando 1  $\mu$ l de producto de PCR teñido con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). Las muestras correctamente amplificadas se purificaron empleando el protocolo ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems™, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Las muestras procesadas con Exosap se enviaron a secuenciar en los laboratorios de Macrogen, Inc (Korea del Sur). Las secuencias resultantes se fueron editadas y ordenadas con el programa Geneious v. 8.0.5 y alineadas en el programa MEGA-X v. 10.0.5 con la opción Clustal W.

### **3.4 Análisis molecular.**

Las secuencias mitocondriales se utilizaron para obtener valores de la diversidad genética de *L. spilonotus* empleando las estimaciones de diversidad haplotípica ( $H_b$ : probabilidad de que dos alelos en una misma muestra sean diferentes) y nucleotídica ( $\pi$ : número de diferencias promedio de nucleótidos por sitio en comparaciones pareadas entre secuencias de ADN) (Nei, 1987) con el programa DNA Sequence Polymorphism v. 6. 12. 03 (Rozas et. al., 2017). Adicionalmente, las redes de haplotipos se elaboraron en Rstudio v. 1.2.1335 (RStudio Team, 2018), empleando el paquete estadístico “Pegas” v. 0.12 (Paradis, 2010), con cada uno de los marcadores empleados y posteriormente se editaron manualmente en Adobe Illustrator. Solo en el caso de ND2, se empleó el paquete “Pegas” de Rstudio para el cálculo de  $H_b$  y  $\pi$ , debido a que algunas secuencias poseían más de un 5% de sitios con estados indefinidos, lo que no permitía el correcto análisis de las poblaciones en DnaSP.

### **3.5 Análisis Filogenéticos.**

El análisis de las relaciones filogenéticas de *L. spilonotus* se realizó utilizando genomas mitocondriales completos, de especies de la familia Rallidae y especies cercanas

a ella, publicados en GenBank (Chen et al. 2017; Stervander et al 2019). El género *Laterallus* no consta con genoma mitocondrial disponible, por lo que en el caso de *L. jamaicensis* se construyó un genoma parcial a partir de las secuencias de genes mitocondriales disponibles en GenBank (COI, CytB, Control Region). La selección de *Grus americana* y *Heliornis Fulica* como grupos externos fue guiada por trabajos de García et. al. (2014a).

La reconstrucción filogenética fue realizada bajo inferencia Bayesiana usando los programas MrBayes v.2.1.3 (Huelsenbeck y Ronquist., 2001) y BEAST v 1.8.4 (Drummond y Rambaud, 2007). La calibración temporal del árbol filogenético para *L. spilonotus* fue realizada utilizando el programa BEAST (Drummond & Rambaut, 2007) usando la información obtenida de Claramunt y Cracraft (2015), la cual estaba basada en calibración fósil. En ambos análisis, se corrió el análisis por 10 millones de generaciones y se muestreó cada mil generaciones, descartando el 10% en burn-in por medio del programa TreeAnnotator (Drummond & Rambaut, 2007). El árbol consenso fue editado y visualizado en FigTree (Rambaut, 2009).

## 4 Resultados

### 4.1 Diversidad genética de genes mitocondriales y del gen RAG-1.

Con el marcador CytB se amplificaron 56 secuencias que tuvieron una longitud de 1025 pb. Estas secuencias se encontraron repartidas en las 4 islas muestreadas según lo que se menciona en la Tabla 2. Con este marcador se encontraron 3 haplotipos únicos repartidos entre la Santa Cruz, Isabela, Pinta y Santiago: hap. 1 en Santa Cruz, Isabela, Pinta y Santiago; hap. 2 en Santa Cruz y Santiago; hap. 3 en Santa Cruz, Isabela y Santiago. La diversidad genética estimada usando a CytB fue baja de acuerdo a los valores de  $Hb$  (0.456) y  $\pi$  (0.00051). Las subpoblaciones con la mayor diversidad haplotípica fueron Santiago y Santa Cruz ( $Hb = 0.626$ , mismo valor en ambas islas), mientras que la diversidad nucleotídica más alta se encontró en Santiago ( $\pi = 0.00076$ ).

Para ND2 se lograron amplificar 46 secuencias, las cuales poseían una longitud de 1148 pb, mismas que se encuentran repartidas según lo mostrado en la Tabla 3. En la población de Galápagos se encontraron 5 haplotipos únicos, repartidos en las 4 islas muestreadas (ver **Figura 1** **Error! Reference source not found.**). ND2 también mostró una diversidad genética baja en la población, pues los valores de  $Hb$  y  $\pi$ , fueron 0.494 y 0.00057, respectivamente. A diferencia de CytB, ND2 presentó 2 haplotipos endémicos, uno para Isabela y otro en Santa Cruz. Santa Cruz fue la subpoblación con una diversidad genética más alta ( $Hb = 0.791$  y  $\pi = 0.00103$ ), resultado que no es extraño pues en esta isla existen 3 haplotipos distintos.

Finalmente se amplificaron 58 secuencias, con una longitud de 379 pb, usando el gen nuclear RAG-1. Este gen mostró el menor número de haplotipos (2, siendo uno de ellos encontrado en un solo individuo de Santiago),  $Hb$  (0.034) y  $\pi$  (0.00011). Como se

ve en la Tabla 4, los valores de  $Hb$  y  $\pi$  fueron 0 para las islas Santa Cruz, Pinta e Isabela, debido a que solo se encontró un haplotipo en estas.

## 4.2 Análisis filogenético.

El análisis filogenético posiciona de forma monofilética, a *L. spilonotus* dentro del clado *Laterallus sensu* García et. al. (2014a), junto con *L. jamaicensis* y *Atlantisia rogersi*. En el trabajo de Stervander et. al. (2019), ya se reportaban a estas dos especies dentro del mismo clado, estableciendo una relación monofilética entre las mismas. En la **Figura 4**, se indica la antigüedad estimada de separación de los nodos. Como se puede observar, *L. spilonotus* comparte su ancestro común más cercano (MRCA) con *L. jamaicensis*. Estas dos especies divergen hace aproximadamente 5.96 millones de años.

Se tiene además que el soporte de probabilidad posterior en los nodos más recientes es de 1 o de valores muy cercanos a 1. Sin embargo, los nodos que tienen una mayor antigüedad presentan valores menores de probabilidad posterior (ver Figura 5). La probabilidad posterior es un concepto de la estadística Bayesiana, el cual describe la probabilidad de que ocurra un evento después de que se tiene en cuenta toda la evidencia previa (Lee, 2004). En el árbol filogenético presentado (ver **Figura 4**), se muestran con barras azules el 95% del intervalo de la densidad posterior más alta (High Posterior Density, HPD), en cada nodo. El intervalo de HPD indica el intervalo más corto, en el espacio de parámetros, que contiene 95% de la probabilidad posterior (Drummond & Rambaut, 2007). Como se ve, los intervalos de 95% de HPD son muy grandes, lo que hace poco confiable a este árbol. Esto concuerda además con el tamaño de muestra efectivo (ESS), calculado en Tracer. El ESS de un parámetro muestreado usando el algoritmo MCMC, es el número de extracciones efectivamente independientes de la

distribución posterior a la que la cadena de Markov es equivalente (Drummond & Rambaut, 2007).

## 5 **Discusión**

### 5.1 **Diversidad genética de *Laterallus spilonotus*.**

La diversidad genética para *L. spilonotus* es baja basándonos en los valores de  $H_b$  y  $\pi$  calculados para cada uno de los marcadores empleados (ver Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4). Estos valores comparados con otra especie de rálido (*Coturnicops noveboracensis*) se asemejan al ser, también valores bajos de  $\pi$  (entre 0.0009 y 0.0019) para el marcador CytB (Miller et. al., 2012) pese a que *C. noveboracensis* es una especie voladora con distribución continental. Miller et. al. (2012) atribuyen esta baja diversidad a la pérdida de hábitat de *C. noveboracensis*, hipótesis que también puede ser aplicada en *L. spilonotus* si ponemos en contexto los resultados obtenidos en el presente estudio con la historia reciente de las islas Galápagos. Uno de los factores que ha contribuido a la reducción del hábitat en Galápagos ha sido sin duda la introducción de especies invasivas tanto vegetales como animales (Schofield, 1989). En el caso puntual de *L. spilonotus*, Donlan et. al. (2007) señalan que esta especie se ha visto amenazada debido a la predación de los sitios de anidación por cerdos ferales (*Sus scrofa*) y por la pérdida de su hábitat ocasionado por la sobrepoblación de cabras (*Capra hircus*) en las islas en las décadas de los 70 y 80's. Gibbs et. al. (2003) muestran una disminución en los registros de *L. spilonotus* en Santa Cruz mientras que Donlan et. al. (2007) señalan que los programas de control de cabras y cerdos en Santiago han generado resultados positivos en el número de individuos de *L. spilonotus* censados.

Por otro lado, las especies vegetales introducidas también representan una amenaza para *L. spilonotus* siendo el árbol de Quinina (*Cinchona pubescens*) una de las

principales. Si bien no se conoce exactamente cómo esta planta invasiva afecta a esta ave (Shriver et. al., 2011), se ha registrado que en zonas en las que *C. pubescens* incrementa su cobertura, la cobertura y riqueza de plantas endémicas decrece debido a que *C. pubescens* reduciría hasta en un 85% la radiación fotosintéticamente activa de las plantas nativas y endémicas. Esto tiene a su vez un impacto directo sobre la biomasa de invertebrados que también estaría disminuyendo, lo cual es problemático si se considera que los invertebrados terrestres son una de las bases en la dieta de *L. spilonotus* (Jäger et. al., 2007). Todos estos impactos antropogénicos sugieren que las poblaciones de esta ave atravesaron por un cuello de botella que podría explicar la baja diversidad genética encontrada.

Los resultados encontrados no concuerdan con lo esperado dada la historia natural de esta especie y las características geográficas del archipiélago. Es decir, que en especies cuyas poblaciones están aisladas y que tienen una limitada capacidad de dispersión, como en *L. spilonotus*, se esperarían encontrar haplotipos endémicos en cada isla, separados por varias mutaciones. Sin embargo, esto no fue el caso ya que en cada uno de los marcadores se encontró un haplotipo predominante compartido entre varias islas, separado de otros por una o dos mutaciones, de los cuales pocos haplotipos endémicos (ver **Figura 3**).

Esta “forma de estrella” que poseen las redes de haplotipos, son característicos en especies que han atravesado un proceso de expansión reciente a partir de su colonización (Klicka et. al., 2011; Sari & Parker, 2012; Chaves et. al., 2012). Las distribuciones de haplotipos también podrían sugerir una posible conectividad reciente entre subpoblaciones e incluso, eventos de recolonización (o rescate “genético”) entre islas.

## 5.2 Análisis filogenético y tiempo de colonización.

En el presente estudio se presenta por primera vez la relación filogenética de *L. spilonotus*. La topología general del árbol filogenético obtenido coincide con la reportada por otros autores como García et. al. (2014a y 2014b), pese a que ciertos nodos más antiguos del árbol no presentaron un buen soporte. Sin embargo, nodos más recientes y en particular la relación de parentesco más cercano dentro del género *Laterallus*, presentaron valores de soporte más altos (ver Figura 5). Estos resultado sugieren que la especie hermana más emparentada a *L. spilonotus* es *L. jamaicensis*, la cual tiene una distribución continental amplia pero restringida a parches en América del Sur (costas de Perú, norte de Brasil y Chile), del Centro, del Norte (costa oeste y este), y en el Caribe (BirdLife International, 2019). Los linajes utilizados de *L. spilonotus* formaron un clado monofilético, lo que sugiere que los ancestros de estas especies llegaron al archipiélago una sola vez dando origen a este grupo. Este patron de un solo origen es común en otras especies de aves en Galápagos como los pinzones de Darwin (Lamichhaney et. al., 2015), cucuves (Arbogast et. al., 2006), canarios María (Chaves et. al., 2012) y sugieren la dificultad de colonización y eventos fundadores en diferentes ocasiones a lo largo del tiempo geológico

El análisis de calibración temporal sugiere que la separación de linajes entre *L. jamaicensis* y *L. spilonotus* se da hace aproximadamente 5.96 millones de años. Este tiempo no coincide con la edad geológica de las islas donde esta especie reside, que son de alrededor de 4 millones de años para las más antiguas (San Cristóbal). Pero esto puede ser contrastado con el modelo paleogeográfico presentado por Gesist et. al. (2014) que sugiere la existencia de hasta 19 islas, ahora sumergidas, que pudieron haber sido colonizadas al menos hace 9 millones de años. Este modelo se apoya con otros estudios filogenéticos los cuales han reportado eventos de colonización incluso más antiguos como

el de *Phyllodactylus* sp. hace 13.2 millones de años (Torres-Carvajal et. al., 2014) o de divergencia, como en el caso de las iguanas marinas (*A. cristatus*), que se habrían separado de los linajes de iguanas terrestres hace 4.5 millones de años, ya en las islas (MacLeod et. al., 2015) y que soportarían la hipótesis presentada sobre el tiempo de colonización de *L. spilonotus* a Galápagos. De acuerdo a lo presentado en este trabajo, se sugiere que *L. spilonotus* sería el ave terrestre más antigua en colonizar el archipiélago.

García et. al. (2017) y Saw et. al. (2006) indican que los efectos fundadores (es decir, pocos individuos) son usualmente relacionados con una baja diversidad genética presente en las poblaciones resultantes de esta colonización. No obstante, si se tiene en cuenta el tiempo de colonización de *L. spilonotus* a las islas (~ 5.96 millones de años) y del aislamiento geográfico entre las subpoblaciones, se esperaría una mayor diversidad genética en esta especie e incluso encontrar posibles linajes divergentes dentro de la misma. Si se pone en contexto histórico de tiempo de colonización con grupos como pinzones de Darwin (colonización estimada 1.3 Mya, (Lamichhaney et. al., 2015)) el cual resultó en la divergencia de 18 especies, o 4.1 en cucuques (Arbogast et. al., 2006), con 4 especies, es curioso que *L. spilonotus* con el tiempo de colonización más antiguo en Galápagos solo cuente con una especie. Las causas por las cuales *L. spilonotus* no ha sufrido eventos de especiación siendo especies con tiempos de colonización amplios son difíciles de explorar. Es posible que esta poca especiación dentro de *L. spilonotus* sea una consecuencia taxonómica de la familia Rallidae. Varias especies de rálidos endémicos insulares presentan muy poca divergencia morfológica de sus especies hermanas separadas por millones de años, ejemplo de ello son las especies del género *Porphyrio* sp que habitan en Oceanía (García-R. & Trewick, 2015). Las poblaciones de *L. spilonotus* mantienen afinidades morfológicas muy similares a *L. jamaicensis* lo cual apoya a esta “resistencia” de especiación. Por otro lado, es posible que aves con predisposición a altas

tasas divergencia sean las que tienen especializaciones dietéticas como es el caso de la radiación adaptativa en los mieleros en Hawaii con 50 especies (Lerner et. al., 2011) y en el caso de pinzones de Darwin con 18 especies (Lamnichaney et al. 2015) ambos ejemplos con especies altamente adaptadas a diferentes tipos de alimento. Es entonces posible que eventos de radiación exitosas tengan como un prerequisite una diferenciación dietética. Es posible que la amplia flexibilidad (generalistas-insectívoros) y poca especialización en la dieta de *L. spilonotus* pueda influenciar, pese a que su colonización es 3 veces más antigua que la de los pinzones de Darwin.

Por otro lado, la plasticidad ecológica y espacial dentro de la familia Rallidae, es una posible razón por la que estas especies sean altamente resilientes a presiones selectivas o eventos como cuellos de botella (García-R et. al., 2014b). No se puede descartar, sin embargo, que existan adaptaciones ecológicas en *L. spilonotus* que se estén expresando fenotípicamente. Pero de ser el caso, estas adaptaciones no serían lo suficientemente fuertes como para sugerir eventos de especiación. Esto se puede ver en los pinzones de Darwin, donde tanto los factores ambientales como los genéticos, serían los responsables de la rápida radiación adaptativa en este grupo de aves (Hedrick, 2019).

## **6 Conclusiones y recomendaciones**

El presente trabajo muestra que la diversidad genética de *L. spilonotus* en Galápagos es muy baja, lo que puede atribuirse a que las poblaciones atravesaron un cuello de botella muy reciente, ocasionado principalmente por la introducción de especies invasoras (tanto animales como vegetales). Otra posible respuesta que se plantea es que existe cierto nivel de flujo génico entre las islas a pesar de estar geográficamente aisladas y de ser una especie con capacidad de dispersión baja. Flujo génico, que podría estar explicado por la conectividad geográfica que pudieron tener las islas en el pleistoceno.

Lo presentado en este trabajo también sugiere que esta especie es una de las más antiguas especies de aves colonizadoras del archipiélago. Su colonización habría sido posible por la presencia de islas, ahora sumergidas, con una edad geológica mayor a las de las islas actuales que conforman el archipiélago. Se determinó además que la especie con la que comparte el ancestro común más cercano es *L. jamaicensis*, que por su distribución geográfica tan amplia dentro del continente americano, no brindaría señales claras de si el evento de colonización de *L. spilonotus* se dio desde el Centroamérica, Sudamérica, o el Caribe.

Para complementar este estudio se sugiere realizar un análisis de la estructura genética de las poblaciones de la polluela de Galápagos, en las islas, que permita reforzar la hipótesis de conectividad genética entre las mismas. También se sugiere emplear marcadores moleculares que posean una mayor tasa evolutiva, como microsatélites, para confirmar la baja diversidad genética encontrada en este estudio.

## 7 Tablas

Tabla 1.-Primers empleados para la secuenciación y PCR

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>	<b>Referencia</b>
<b>Cytb</b>		
L14990	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	(Bonaccorso et al., 2010)
H16065	GGAGTCTTCAGTCTCTGGTTTACAAGAC	(Bonaccorso et al., 2010)
<b>ND2</b>		
L5143	GAACCTACACARAAGRGATCAAAAC	(Bonaccorso et al., 2010)
H6313	ACTCTTRTTTAAGGCTTTGAAGGC	(Bonaccorso et al., 2010)
<b>RAG-1</b>		
R52	CAAGCAGATGAAYTGGAGGC	(Johansson et. al., 2001)

R53	TCCATGTCCTTTAAGGCACA	(Johansson et. al., 2001)
-----	----------------------	---------------------------

Tabla 2. Estimaciones genéticas de población para islas muestreadas basadas en CytB.

<b>Isla</b>	<b>n</b>	<b>Haplotipos</b>	<b>Sitios polimórficos</b>	<b>Hb</b>	<b><math>\pi</math></b>
Santa Cruz	14	3	2	0.626±0.104	0.00073±0.00016
Isabela	16	2	1	0.125±0.106	0.00013±0.00011
Pinta	9	1	0	0.00±0.00	0.00±0.00
Santiago	21	3	2	0.626±0.082	0.00076±0.00013
Galápagos	56	3	2	0.439±0.069	0.00066±0.00012

Tabla 3. Estimaciones genéticas de población para islas muestreadas basadas en ND2.

<b>Isla</b>	<b>n</b>	<b>#Haplotipos</b>	<b>Sitios polimórficos</b>	<b>Hb</b>	<b><math>\pi</math></b>
Santa Cruz	14	4	3	0.791	0.00103
Isabela	16	2	1	0.458	0.00043
Pinta	3	1	0	0.000	0.000
Santiago	13	3	1	0.500	0.00039
Galápagos	46	5	3	0.494	0.00057

Tabla 4. Estimaciones genéticas de población para islas muestreadas basadas en RAG-1.

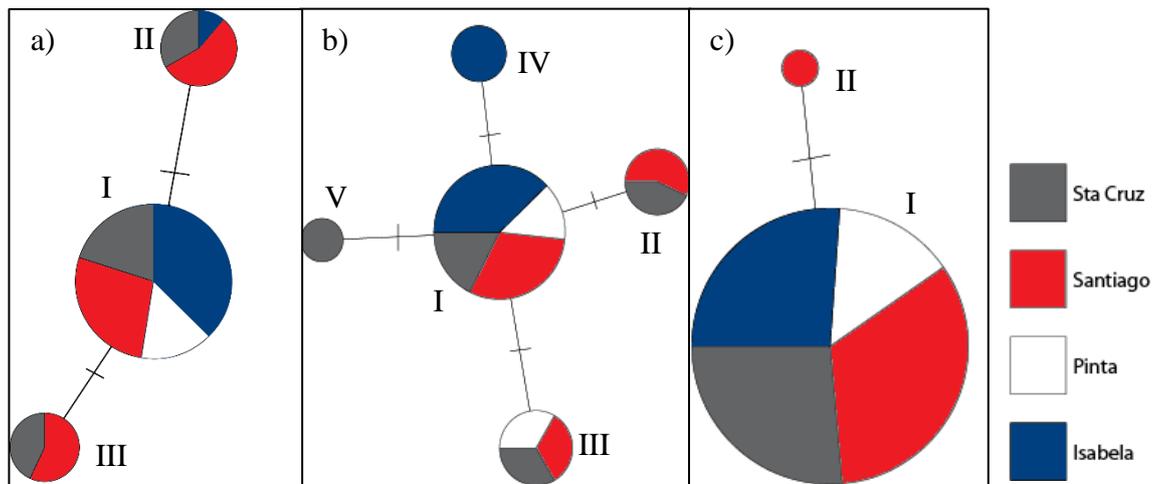
<b>Isla</b>	<b>n</b>	<b>#Haplotipos</b>	<b>Sitios polimórficos</b>	<b>Hb</b>	<b><math>\pi</math></b>
Santa Cruz	15	1	0	0.00±0.00	0.00±0.00
Isabela	15	1	0	0.00±0.00	0.00±0.00
Pinta	8	1	0	0.00±0.00	0.00±0.00
Santiago	20	2	1	0.100±0.00774	0.00029±0.00026
Galápagos	58	2	1	0.034±0.033	0.00011±0.00011

**8 Figuras**

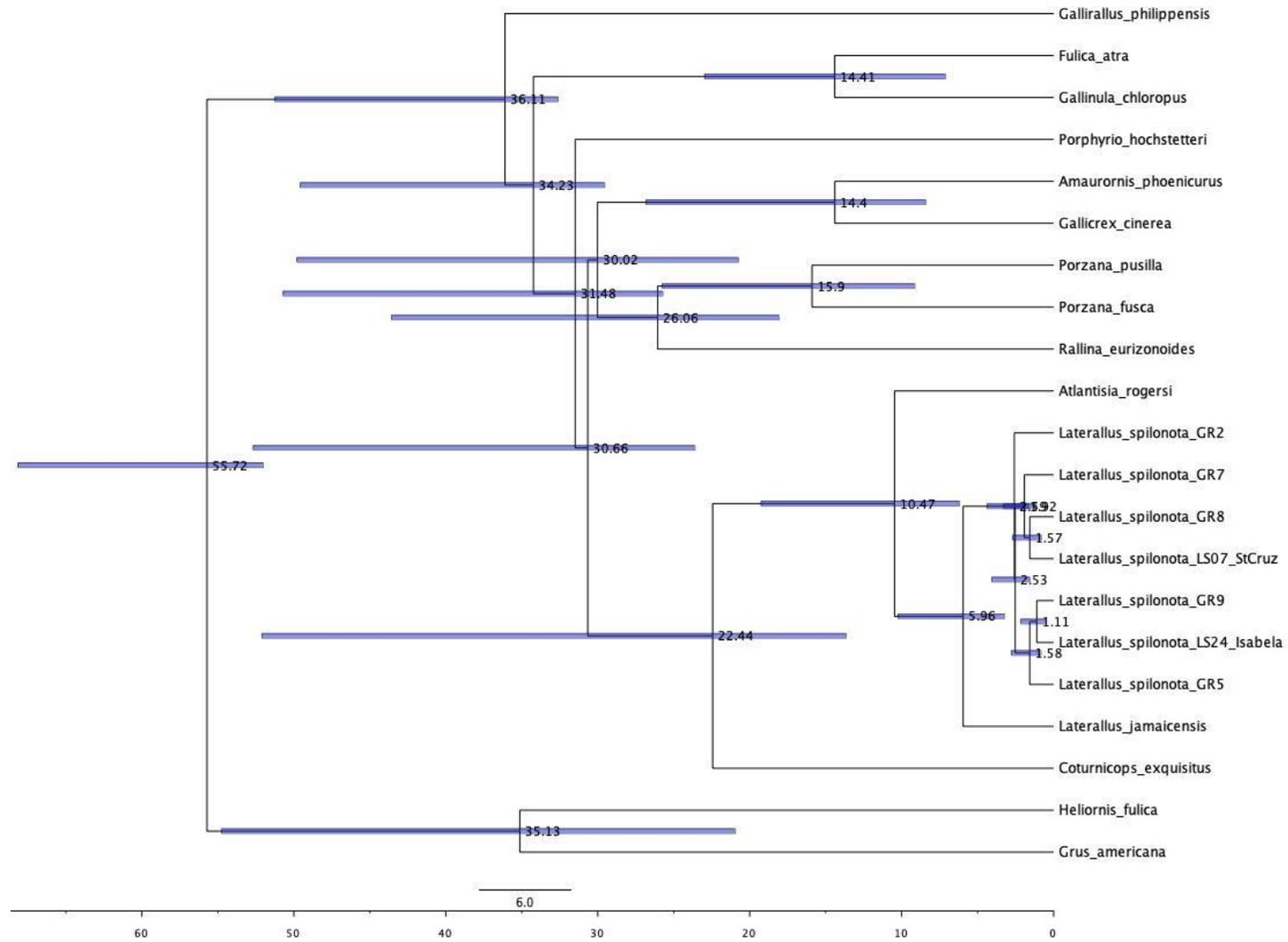
**Figura 1.** Trampa de captura empleando malla de gallinero.



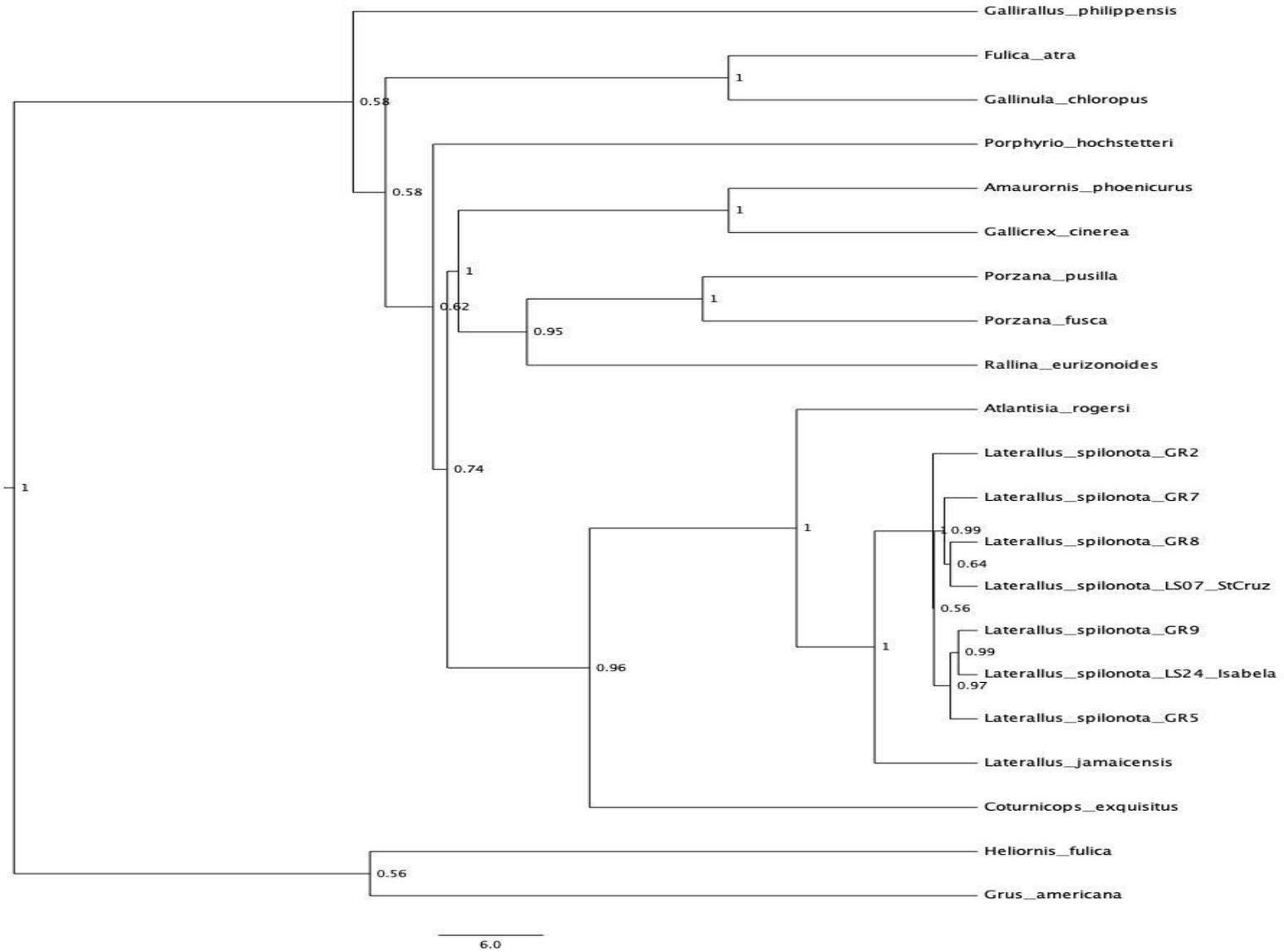
**Figura 2.** Individuos capturados en Isabela que presentan ligera diferencia en la tonalidad de patas y plumaje.



**Figura 3.-** Redes de haplotipos elaboradas con a) CytB; b) ND-2 y c) RAG-1. A la derecha de la imagen se muestra la clave de color asignada a cada isla. En cada uno de los gráficos, se muestran en números romanos los haplotipos que se encontraron.



**Figura 4.-** Árbol filogenético. En este árbol se muestran las edades de divergencia en cada nodo, junto con los intervalos de 95 % HPD.



**Figura 5.-** Árbol filogenético. En este árbol se muestra la probabilidad posterior de cada nodo.

## 9 Referencias

- Arbogast, B. S., Drovetski, S. V., Curry, R. L., Boag, P. T., Seutin, G., Grant, P., . . .
- Anderson, D. (2006). The origin and diversification of Galapagos mockingbirds. *Evolution*, 60(2), 370-382.
- BirdLife International. (2016). *Laterallus spilonota*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2016*, e.T22692366A93350608.
- BirdLife International. (2019). *Laterallus jamaicensis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2019*, e.T22692353A154165751.
- Bollmer, J. L., Whiteman, N. K., Sarasola, J. H., & Parker, P. G. (2006). Phylogeography of the Galápagos hawk (*Buteo galapagoensis*): a recent arrival to the Galápagos Islands. *Molecular phylogenetics and evolution*, 39(1), 237-247.
- Bonaccorso, E., Guayasamin, J., Peterson, A. T., & Navarro-Sigüenza, A. (2010). Molecular phylogeny and systematics of Neotropical toucanets in the genus *Aulacorhynchus* (Aves, Ramphastidae). *Zoologica Scripta*, 40(4), 336-349.
- Chakraborty, R. (1993). Analysis of genetic structure of populations: meaning, methods, and implications. In P. Majumder (Ed.), *Human population genetics* (pp. 189-206). Boston: Springer.
- Chaves, J. A., Parker, P. G., & Smith, T. B. (2012). Origin and population history of a recent colonizer, the yellow warbler in Galápagos and Cocos Islands. *Journal of evolutionary Biology*, 25(3), 509-521.

- Chen, P., Han, Y., Zhu, C., Gao, B., & Ruan, L. (2017). Complete mitochondrial genome of *Porzana fusca* and *Porzana pusilla* and phylogenetic relationship of 16 Rallidae species. *Genetica*, *145*(6), 559-573.
- Claramunt, J. A., & Cracraft, J. (2015). A new time tree reveals Earth history's imprint on the evolution of modern birds. *Science advances*, *1*(11), e1501005.
- De León, L. F., Sharpe, D. M., Gotanda, K. M., Raeymaekers, J. A., Chaves, J. A., Hendry, A. P., & Podos, J. (2019). Urbanization erodes niche segregation in Darwin's finches. *Evolutionary applications*, *12*(7), 1329-1343.
- Donlan, C. J., Campbell, K., Cabrera, W., Lavoie, C., Carrion, V., & Cruz, F. (2007). Recovery of the Galapagos Rail (*Laterallus spilonotus*) Following the Removal of Invasive Mammals. *Biological Conservation*, *138*(3-4), 520-524.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, *7*(1), 214.
- Franklin, A., Clark, D., & Clark, D. (1979). Ecology and Behavior of the Galapagos Rail. *The Wilson Bulletin*, *91*(2), 202-221.
- García-R, J., Gibb, G. C., & Trewick, S. A. (2014). Deep global evolutionary radiation in birds: Diversification and trait evolution in the cosmopolitan bird family Rallidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *81*, 96-108.
- García-R, J., Gibb, G. C., & Trewick, S. A. (2014). Eocene Diversification of Crown Group Rails (Aves: Gruiformes: Rallidae). *PLoS ONE*, *9*(10), e109635.
- García-R., J. C., & Trewick, S. (2015). Dispersal and speciation in purple swamphens (Rallidae: Porphyrio). *The Auk: Ornithological Advances*, *132*(1), 140-155.

- Geist, D. J., Snell, H., Snell, H., Goddard, C., & Kurz, M. D. (2014). A paleogeographic model of the Galápagos Islands and biogeographical and evolutionary implications. In K. Harpp, E. Mittelstaedt, N. d'Ozouville, & D. Graham, *The Galápagos: a natural laboratory for the Earth Sciences*. (pp. 145-166). Washinton DC: American Geophysical Union.
- Gibbs, J. P., Shriver, W. G., & Vargas, H. (2003). An assesment of a Galapagos Rail population over thirteen years (1986 to 2000). *Journal of Field Ornithology*, 74(2), 136-140.
- Grant, B. (2003). Evolution in Darwin's finches: a review of a study on Isla Daphne Major in the Galapagos Archipelago. *Zoology*, 106(4), 255-259.
- Hedrick, P. W. (2019). Galapagos Islands Endemic Vertebrates: A Population Genetics Perspective. *Journal of Heredity*, 110(2), 137-157.
- Holt, B. G., & Jønsson, K. A. (2014). Reconciling hierarchical taxonomy with molecular phylogenies. *Systematic Biology*, 63(6), 1010-1017.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist., F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- Jäger, H., Tye, A., & Kowarik, I. (2007). Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (*Cinchona pubescens*) trees on native vegetaion in Galápagos. *Biological Conservation*, 140(3-4), 297-307.
- Johansson, U. S., Parsons, T. J., Irestedt, M., & Ericson, P. (2001). Clades within the "higher land birds", evaluated by nuclear DNA sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 39(1-2), 37-52.

- Klicka, J., Spellman, G., Winker, K., Chua, V., & Smith, B. (2011). A phylogeographic and population genetic analysis of a widespread, sedentary north american bird: the hairy woodpecker (*Picoides villosus*). *The Auk*, *128*(2), 346-362.
- Lamichhaney, S., Berglund, J., Almén, M., Maqbool, K., G. M., Martinez-Barrio, A., . . . Zamani, N. (2015). Evolution of Darwin's finches and their beaks revealed by genome sequencing. *Nature*, *518*, 371-375.
- Leck, C. F. (1980). Establishment of New Population Centers with Changes in Migration Patterns. *Journal of Field Ornithology*, *51*(2), 168-173.
- Lee, P. (2004). *Bayesian statistics*. London: Arnold.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, *6*(9), 1110-1116.
- Lerner, H. R., Meyer, M., James, H. F., Hofreiter, M., & Fleischer, R. C. (2011). Multilocus resolution of phylogeny and timescale in the extant adaptive radiation of Hawaiian honeycreepers. *Current Biology*, *21*(21), 1838-1844.
- MacLeod, A., Rodríguez, A., Vences, M., Orozco-terWengel, P., García, C., Trillmich, F., . . . Steinfartz, S. (2015). Hybridization masks speciation in the evolutionary history of the Galápagos marine iguana. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1809), 20150425.
- Miller, M. P., Haig, S. M., Mullins, T., Popper, K. J., & Green, M. (2012). Evidence for population bottlenecks and subtle genetic structure in the yellow rail. *The Condor*, *114*(1), 100-112.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.

- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics*, 26, 419-420.
- Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2(131).
- Petren, K., Grant, P. R., Grant, B. R., & Keller, L. F. (2005). Comparative landscape genetics and the adaptive radiation of Darwin's finches: the role of peripheral isolation. *Molecular Ecology*, 14(10), 2943-2957.
- Rambaut, A. (2009). FigTree version 1.3.1 [computer program]. From <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsís, S. E., & Sánchez-García, A. (2017). DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology & Evolution*, 34, 3299-3302.
- RStudio Team. (2018). RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Boston, Massachusetts.
- Sari, E., & Bollmer, J. (2018). Colonization of Galápagos Birds: Identifying the Closest Relative and Estimating Colonization. In P. Parker, *Disease Ecology. Social and Ecological Interactions in the Galapagos Islands* (pp. 15-43). Springer International Publishing.
- Sari, E., & Parker, P. (2012). Understanding the colonization history of the Galápagos flycatcher (*Myiarchus magnirostris*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63, 244-254.

- Sato, A., Tichy, H., O'hUigin, C., Grant, P., Grant, B., & Klein, J. (2001). On the origin of Darwin's finches. *Mol Biol Evol*, *18*, 299-311.
- Saw, J., Endersby, N., & McKechnie, S. (2006). Low mtDNA diversity among widespread Australian diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) suggests isolation and a founder effect. *Insect Science*, *13*, 365-372.
- Schofield, E. K. (1989). Effects of Introduced Plants and Animals on Island Vegetation: Examples from the Galapagos Archipelago. *Conservation Biology*, *3*(3), 227-238.
- Sherwin, W. B., & Moritz, C. (2000). Managing and monitoring genetic erosion. In A. Young, & G. Clarke (Eds.), *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. (pp. 9-34). Cambridge: Cambridge University Press.
- Shriver, G., Gibbs, J., Woltz, H., Schwarz, N., & Pepper, M. (2011). Galápagos Rail *Laterallus spilonotus* population change associated with habitat invasion by the Red-barked Quinine Tree *Cinchona pubescens*. *Bird Conservation International*, *21*, 221-227.
- Stervander, M., Ryan, P. G., Melo, M., & Hansson, B. (2019). The origin of the world's smallest flightless bird, the Inaccessible Island Rail *Atlantisia rogersi* (Aves: Rallidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *130*, 92-98.
- Sullivan, B. L., Wood, C. L., Iliff, M. J., Bonney, R. E., & Kelling, S. (2009). eBird: A citizen-based bird observation network in the biological sciences. *Biological Conservation*, *142*(10), 2282-2292.

Taylor, B. (1998). *Rails: A Guide to Rails, Crakes, Gallinules and Coots of the World*. Pica Press.

Torres-Carvajal, O., Barnes, C., Pozo-Andrade, M., Tapia, W., & Nicholls, G. (2014). Older than the islands: origin and diversification of Gala'pagos leaf-toed geckos (Phyllodactylidae: Phyllodactylus) by multiple colonizations. *Journal of Biogeography*, *41*(10), 1883-1894.