

Análisis de la estructura genética de una población de *Iberolacerta monticola* usando polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en marcadores distribuidos por todo el genoma

Elena Beade Toubes, *Universidade da Coruña - e.bead@udc.es*
 Horacio Naveira Fachal, *Universidade da Coruña - horacio.naveira.fachal@udc.es*

Resumen—Las nuevas técnicas de secuenciación permiten la identificación de una gran cantidad de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), que pueden ser empleados para detectar el grado de variación en una muestra de individuos y aplicarse a estudios poblacionales. En este trabajo se analizaron 90 individuos del lacértido *Iberolacerta monticola* de la población presente en la ZEC Betanzos-Mandeo. Se empleó el *pipeline* de STACKS para obtener, a partir de las lecturas procesadas, un catálogo de loci, genotipar todos los individuos y llevar a cabo el análisis genético de la población. Previamente a la ejecución, se realizó una exploración del espacio paramétrico. Además, se elaboró una lista negra de loci para poder restringir los análisis poblacionales a loci autosómicos. El estudio concluye con la determinación de la estructura genética de la población, que permitió observar el grado de fragmentación y detectar barreras que pueden estar afectando a la supervivencia de la misma.

Index Terms—estructura genética poblacional, lacértidos, *MobiSeq*, SNPs, STACKS



1. INTRODUCCIÓN

EN los últimos años, los métodos de secuenciación masiva de ADN, conocidos como secuenciación de nueva generación o NGS por sus siglas en inglés (*Next Generation Sequencing*), como son los desarrollados por la tecnología Illumina, han permitido que sea posible obtener millares de lecturas de una numerosa muestra de individuos en un tiempo y con un coste considerablemente reducidos. Estas tecnologías permiten, entre otras cosas, la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs por sus siglas en inglés), que son empleados frecuentemente para identificar variantes genéticas asociadas a determinadas patologías, pero también a caracteres fenotípicos de interés en el ámbito de la ecología y la evolución (GWAS, *Genome Wide Association Studies*).

El procesamiento de esta enorme cantidad de datos supone un gran reto informático, que debe abordarse en sucesivas etapas. En primer lugar, deben demultiplexarse los datos en bruto, tras lo que se debe llevar a cabo un preprocesamiento que elimine las lecturas de baja calidad. Una vez realizado esto, se puede efectuar un alineamiento de las lecturas que permite construir secuencias consenso, localizar supuestos loci e identificar diferentes alelos, para finalmente identificar los SNPs y poder genotipar cada individuo para cada uno de ellos. Para completar estas tareas, se han desarrollado multitud de *softwares* que permiten ejecutar estos pasos y modificar diversos parámetros para que se ajusten al tipo de estudio que se quiere hacer.

El *pipeline* de STACKS [1–4] ofrece una herramienta para automatizar estas tareas, especialmente útil cuando se trata de datos sin un genoma de referencia contra el que alinear las lecturas (lo que se llama análisis *de novo* [5]) y los datos son el producto de una secuenciación de extremos pareados

[6, 7].

Uno de los usos habituales que se les dan a estos métodos es su aplicación para determinar la estructura genética de poblaciones naturales [7, 8], la cual viene dada por los vínculos reproductivos entre los individuos que las componen. La detección de una cantidad significativa de SNPs repartidos por todo el genoma puede resultar muy informativa a la hora de detectar variaciones dentro de los individuos de una población y así poder inferir su estructura. Sin embargo, estas técnicas suponen una serie de complicaciones ya no solo a nivel informático, sino también de índole biológica, que corresponden al ámbito de la genética de poblaciones y la evolución y que de no ser debidamente resueltos pueden dar resultados equívocos y esconder la estructura real de la población [6, 9]. Así, la organización de estos marcadores será diferente para los que estén ligados a cromosomas sexuales y a cromosomas autosómicos. Por otro lado, también puede haber diferencias entre sexos mantenidas por selección natural, que puede resultar especialmente significativa si la representación de ambos sexos en la muestra de individuos está sesgada [10]. Además, hay que tener en cuenta que no todos los alelos tienen el mismo valor informativo, sino que son los alelos raros precisamente los más importantes para ello, por lo que hay que establecer una serie de umbrales que permitan su detección [11–13].

El conocimiento de la estructura genética de una población natural permite estimar la magnitud de barreras que obstaculizan el flujo génico entre distintas áreas ocupadas por individuos de una misma especie [14]. Estas barreras pueden estar asociadas a elementos predefinidos del paisaje, tener un origen antrópico o incluso se pueden desvelar

barreras crípticas que obedecen a factores no previstos o de origen desconocido. Esto permite estimar el grado de fragmentación de las poblaciones, lo cual es un indicador de la alteración del hábitat y un factor que incide directamente en el riesgo de extinción al provocar una aceleración en la pérdida de la diversidad genética [15, 16]. Estos fenómenos, aunque forman parte de la dinámica natural se están viendo multiplicados por la acción del hombre, cuyo impacto se produce cada vez a mayor escala, siendo su máximo exponente el escenario de cambio climático global al que nos vemos abocados.

Este trabajo se enmarca en un estudio piloto sobre el impacto del cambio climático en poblaciones de pequeños vertebrados en la zona de especial conservación (ZEC) Betanzos-Mandeo de la red Natura 2000. Así, se ha estudiado la población del lacértido *Iberolacerta monticola* que se extiende de forma discontinua a lo largo de las riberas del cauce de este río. Esta especie está incluida en el *Catálogo Galego de Especies Amenazadas* [17] y las poblaciones de baja altitud asociadas a gargantas fluviales, como la que ocupa este trabajo, se consideran las más amenazadas, habiendo sufrido importantes declives poblacionales en los últimos años y un progresivo fraccionamiento [18, 19]. Los esfuerzos encaminados a contener el riesgo de extinción deben ser guiados por criterios científicos que señalen elementos del paisaje claves para mantener la conectividad de las poblaciones. Además, por sus características biológicas, el estudio de la conectividad y estructura de esta población podría utilizarse como indicador del grado de amenaza al que está sometido la zona y orientar posibles acciones que se diseñen, bien sea para reparar el hábitat o para su preservación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Población de estudio y muestreo

Se analizaron un total de 90 individuos de *Iberolacerta monticola*, 33 machos y 57 hembras, que fueron capturados entre el mes de junio de 2018 y abril de 2019. Para su captura se empleó una varilla telescópica con un lazo corredizo en su extremo. Esta forma de captura no supone daño para los animales. Tras su captura se tomaron datos sobre el sexo, edad y medidas morfológicas, y se les cortó el extremo de la cola, que se transfirió a un tubo con alcohol absoluto, donde se conservó hasta la extracción de su ADN. Se anotó también la localización precisa de cada individuo en el punto de su captura, donde por último fueron liberados tras su procesamiento (la cola se regenera espontáneamente).

La población de estudio corresponde a la de la Cuenca del río Mandeo (UTM 29T NH69-79-78, ayuntamientos de Betanzos, Coirós, Paderne, Irixoa, Aranga y Curtis, provincia de A Coruña) donde a su vez podemos distinguir varias subpoblaciones, relativamente aisladas por hábitats inadecuados entre ellas. De forma genérica, se establecen dos subpoblaciones principales: la correspondiente al tramo inferior, que va desde el coto fluvial de Chelo hasta 9 km río arriba en Ponte Xielas, y la que corresponde al tramo superior, en el cañón del Mandeo, situado entre Aranga y A Castellana (Figura 1). Dentro de estas dos subpoblaciones, se diferenciaron hasta 10 localizaciones diferentes, posibles subpoblaciones, 8 pertenecientes al tramo inferior y 2 al

Tabla 1
Poblaciones de estudio

ID	Zona	Tramo	N	Machos	Hembras
1	Chelo		40	13	27
2	Espenuca		4	2	2
3	Chelo-Zarzo		2	1	1
4	Zarzo	Inferior	11	5	6
5	As Balsas		9	4	5
6	As Pías		6	2	4
7	Ambaslasaugas		6	1	5
8	Ponte Xielas		1	0	1
9	Ponte Aranga	Superior	9	5	4
10	Cañón		2	0	2

tramo superior. En la Tabla 1 se recogen los diferentes lugares de muestreo y el número de individuos capturados (machos y hembras). En el Anexo I se muestra información del lugar de muestreo y del sexo para cada uno de los individuos capturados.

2.2. Técnicas moleculares

Para cada una de las 90 muestras se aisló el ADN y se construyó una genoteca siguiendo el método *MobiSeq* [20], para el cual se seleccionó como marcador un elemento transponible (TE) del tipo SINE (del inglés *Short Interspersed Nuclear Elements*) con decenas de miles de copias insertas por todo el genoma. Una vez indexadas las muestras se secuenciaron mediante un *Illumina NovaSeq PE150*, obteniéndose unos 60 Gb de lecturas de ADN. Estas lecturas son *paired-end* o de extremos pareados de 150 nucleótidos.

2.3. Análisis de calidad y preprocesado de las lecturas

Tras esto, se analizó la calidad de las secuencias utilizando FASTQC 0.1.5 [21] y usando MULTIQC [22] para generar los gráficos resumen de este análisis.

A continuación, se llevó a cabo el preprocesado de estas lecturas. Para eliminar productos de la secuenciación repetida del mismo fragmento de ADN (con lecturas idénticas *forward* y *reverse*) se utilizó el *script clumpify.sh*, contenido en el paquete BBMAP [23]. Para eliminar los adaptadores y trincar las lecturas a 140 nucleótidos se utilizó TRIM-MOMATIC 0.36 (opción *Illuminaclip*) [24]. Las lecturas con longitud inferior a 140 nucleótidos o con una calidad promedio inferior a 26 se descartaron para el resto del análisis. CUTADAPT 1.3 [25] se usó para eliminar las secuencias que no presentaban los debidos cebadores en sus extremos 5' y 3', permitiéndose hasta un máximo de 2 diferencias nucleotídicas. Además, se empleó el *script* PROCESS_RADTAGS de STACKS 2.5 [3] como una evaluación adicional de la calidad de las lecturas.

Los pasos previos al genotipado de las muestras fueron llevados a cabo por la empresa AllGenetics & Biology SL (www.allgenetics.eu).

2.4. Genotipado

Una vez preprocesadas y filtradas, las lecturas en formato FastQC se emplearon como *input* para la ejecución del *pipeline de novo* de STACKS [1, 3, 4]. Este ejecuta 5 programas diferentes que son: USTACKS (compara lecturas de cada individuo construyendo lo que denomina *stacks*,

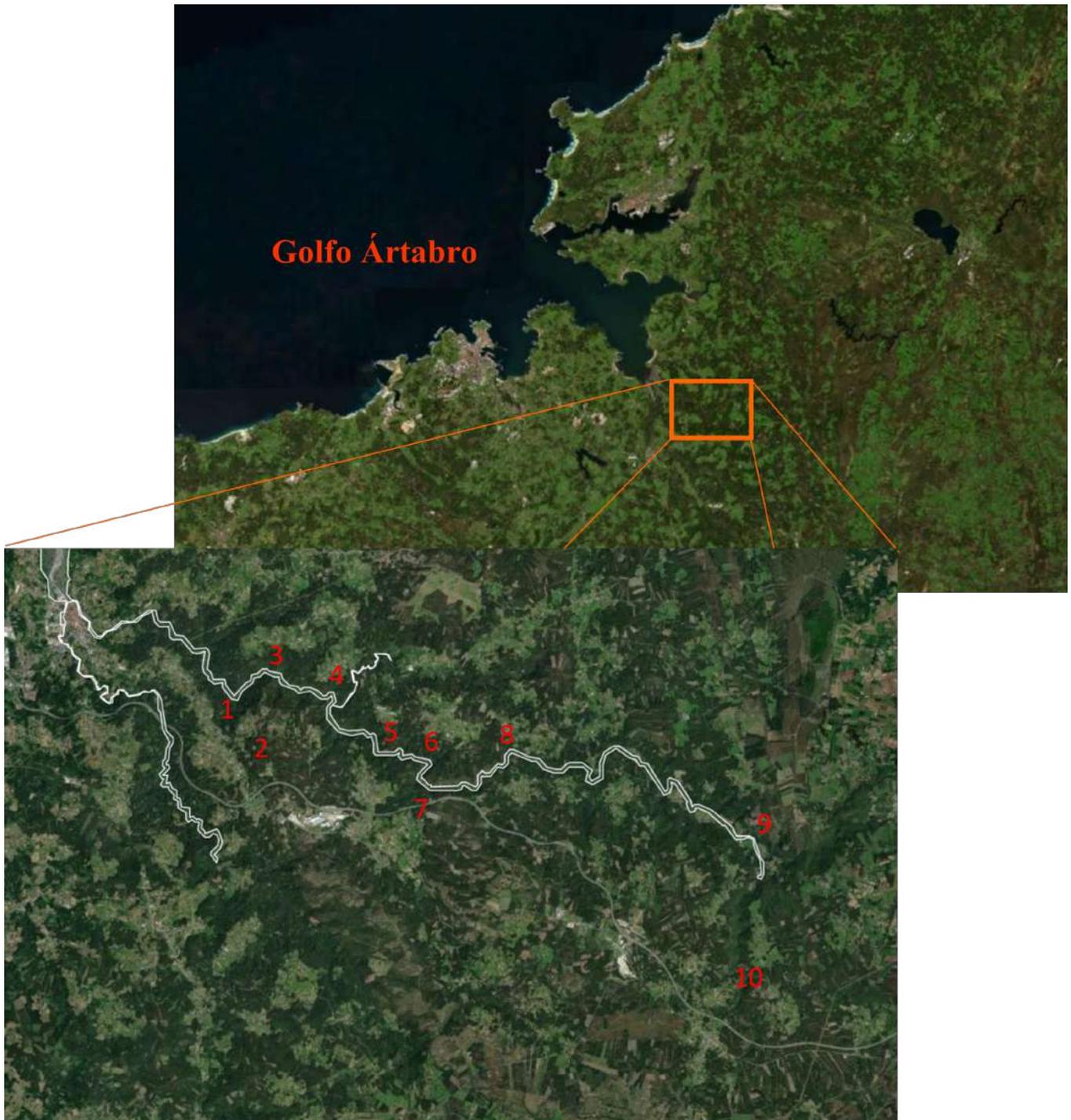


Figura 1. Localización geográfica de la zona de estudio. En la imagen inferior aparece en blanco la ZEC Betanzos-Mandeo y están numeradas todas las zonas de muestreo siguiendo el código que se recoge en la Tabla 1. Imágenes aéreas obtenidas del visor del IGN (<https://www.ign.es/iberpix2/visor/>) a escala 1:422293 (arriba) y 1:105223 (abajo)

forma un set de loci y encuentra SNPs para cada individuo), CSTACKS (construye un catálogo de loci atendiendo a los loci homólogos entre las diferentes muestras), SSTACKS (realiza una búsqueda de los loci de cada muestra enfrentándolos al catálogo), TSV2BAM (que organiza los datos por muestra en vez de por locus), GSTACKS (que llama a los SNPs en la población y genotipa cada muestra en estos sitios), y por último POPULATIONS (que realiza el análisis genético poblacional y obtiene una serie de estadísticas derivadas de este). En la Figura 2 podemos ver una esquematización de algunos de los pasos de este *pipeline*.

2.4.1. Exploración del espacio paramétrico

Antes de ejecutar el *pipeline* para todas las muestras, se llevó a cabo una exploración del espacio paramétrico de STACKS, realizando ensayos con 16 de las muestras (8 del tramo inferior y 8 del tramo superior) y variando los parámetros M (distancia máxima en nucleótidos permitida entre *stacks*) y n (número de diferencias permitidas entre loci para construir el catálogo) entre 1 y 8 y con el parámetro m (lecturas mínimas necesarias para formar un *stack*) fijado en 3 para todos los casos. Además, también se modificó el parámetro *var* y *gt*, que marcan los umbrales de alfa para la detección de SNPs y para llamar a los genotipos, fijando un valor de 0,05 para algunas combinaciones y 0,01 para otras. Así, las combinaciones de parámetros que se probaron fueron: M1n1, M1n2, M1n3, M2n1, M2n2, M2n3, M3n1, M3n2, M3n3, M3n4, M5n5, M5n6, M7n6, M7n7, M7n8, M5n5gt05, M5n5gt05var05, M1n2gt05var05 y M2n1gt05var05 (las combinaciones en que no se indica el *var* y *gt* estos estaban fijados en 0,01). Tras esto se visualizó la distribución de loci frente al número de SNPs por locus y se determinó la combinación óptima de parámetros. Una vez obtenida, se ejecutó el *pipeline* para las 90 muestras.

2.4.2. Detección de loci ligados al sexo y mitocondriales

Aunque con estos pasos ya habría datos para poder llevar a cabo un estudio poblacional, hay que tener en cuenta que la distribución de la variación genética no es la misma para todos los loci, sino que depende del tipo de genoma y de sus patrones de herencia. Así, antes de proceder al análisis genético-poblacional, deben identificarse y catalogarse los loci ligados al genoma mitocondrial y a los cromosomas sexuales (Z y W).

Para localizar estos loci se aplicaron una serie de filtros sobre los *outputs* de POPULATIONS de STACKS basados en los patrones de variación genética esperados en este tipo de loci para ambos sexos, complementados por alineamientos sobre el genoma de una especie próxima, *Podarcis muralis* (tiempo estimado de divergencia 15 millones de años) [26], y búsquedas sobre bases de datos públicas.

En primer lugar, para localizar los loci ligados a W, se ejecutó POPULATIONS sobre el catálogo de todos los loci obtenidos, pero esta vez para una población de solo 10 hembras, exigiendo que se quedase con los loci presentes en al menos 8 de las 10 hembras (parámetro $R = 0,8$) y a continuación se ejecutó lo mismo para 10 machos, esta vez exigiendo que se quedase con los loci que estén presentes en alguno de los individuos ($R = 0,1$). Se compararon los dos listados resultantes de loci y aquellos que solo estaban presentes en las hembras se consideraron ligados a W. Esto

permitió además sexar algunos individuos cuyo sexo era dudoso en el momento de la captura por ser juveniles.

Para localizar los loci ligados a Z se ejecutó POPULATIONS aportando como poblaciones los machos y las hembras y con un $R = 0,8$, es decir, que se filtrasen aquellos loci que no estuviesen presentes en al menos 8 de cada 10 individuos. Tras esto, se filtraron los loci atendiendo a la heterocigosidad observada (Het_O), teniendo en cuenta que las hembras de reptiles son hemicigóticas para este cromosoma (WZ), por lo que la heterocigosidad esperada (Het_E) es 0. Así, se tomaron como ligados al Z aquellos en que la Het_O es mayor que 0,25 para los machos y menor que 0,04 para las hembras (permitiendo así un margen de error asociado a la secuenciación). Para aquellos que se identificaron como ligados a Z se comprobó si estaban alineados en este cromosoma en *Podarcis muralis* y, además, se comprobó si había otros loci no filtrados por las anteriores condiciones que también mapeaban sobre el Z en esta especie. Para ello se empleó la herramienta BWA [27], cuyo *output* en formato SAM permite comprobar esto. Dado que a lo largo de la evolución de estas dos especies es posible que se hayan producido traslocaciones cromosómicas entre el Z y los autosomas, se hizo un análisis adicional del grado de cobertura de las lecturas para ambos sexos para una serie de loci, pues lo esperado sería que, para las hembras, la cobertura de los loci ligados al Z fuese del orden de la mitad que en machos. Para calcular la cobertura relativa (y así evitar diferencias debidas a la calidad de cada muestra) se calculó la cobertura media para un total de 7516 loci que con seguridad eran autosómicos (relación de Het_O en hembras frente a Het_O en machos mayor que 0,8 y Het_O en machos mayor que 0,1) y se obtuvo la relación entre la cobertura de cada loci sospechoso de estar ligado a Z y la cobertura de los autosómicos.

Para detectar los loci mitocondriales, que como tales corresponden a un genoma haploide, se filtraron aquellos en los que la Het_E en machos era mayor que 0,2 y la Het_O tanto para machos como para hembras resultaba ser de 0. Además, los loci filtrados se buscaron en las bases de datos del NCBI mediante la herramienta web BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), empleando como *queries* las secuencias nucleotídicas consenso obtenidas por STACKS para esos loci, con los valores paramétricos por defecto. También se comprobó su cobertura relativa, como se hizo para los loci sospechosos de estar ligados a Z, pues lo esperado para un locus mitocondrial es que la cobertura estuviera muy por encima de la observada en loci nucleares autosómicos (hay varios miles de copias del genoma mitocondrial por célula).

2.4.3. Análisis de la estructura poblacional

Una vez obtenidos estos loci, se ejecutó el módulo POPULATIONS de nuevo incluyendo una lista negra con estos loci para que los descartase a la hora de obtener los estadísticos poblacionales. Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: $R = 0,8$ (proporción de individuos en toda la muestra en la que debe estar presente un locus para ser tenido en cuenta), *min-maf* = 0,01 (frecuencia mínima del alelo menos frecuente) y *max-obs-het* = 0,7 (heterocigosidad observada máxima) y, además, se activó la opción *write-single-SNP*, que restringe el análisis a solo el primer SNP por

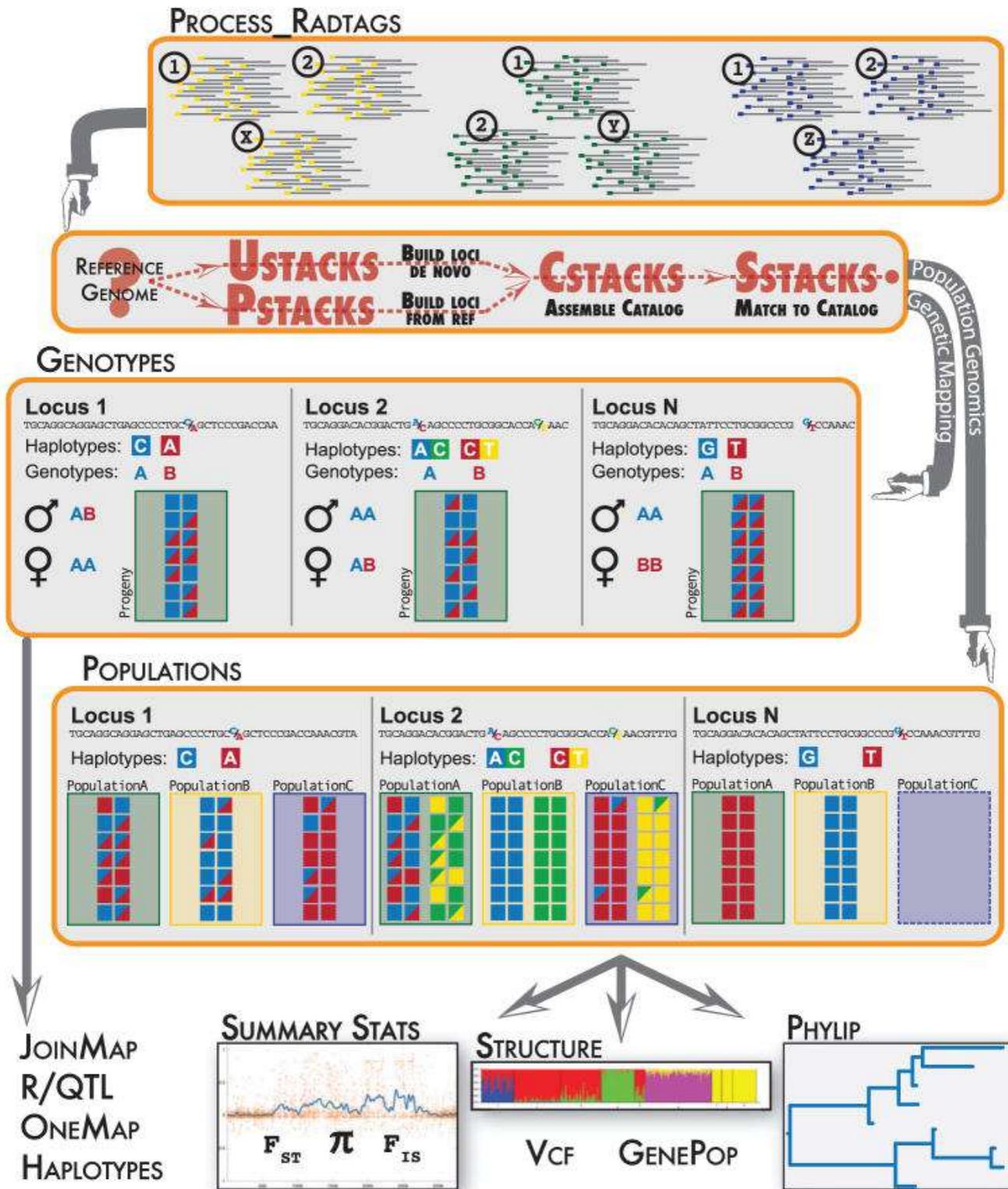


Figura 2. Pipeline de STACKS [2]

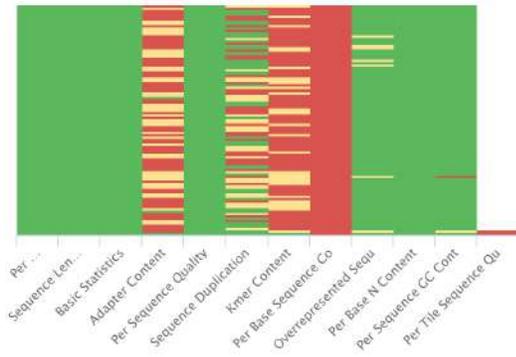


Figura 3. Resultados de los análisis de calidad. Cada columna representa un parámetro de calidad, mientras que cada barra es cada una de las muestras. Una barra en verde significa que esa muestra está por encima del umbral de calidad para ese parámetro, en amarillo está en este umbral y en rojo por debajo de este

locus. Unos de los *outputs* que ofrece este módulo son los archivos PLINK, que sirven como *input* para el programa FASTSTRUCTURE [28], que es el que infiere finalmente la estructura de la población, empleando una aproximación bayesiana. Para este programa se utilizó una K máxima de 10 (complejidad del modelo o número de poblaciones máximos). El resultado de esta ejecución se visualizó en el programa disponible online CLUMPACK [29], que permite obtener una gráfica de la estructura de la población dada.

2.5. Recursos informáticos

La ejecución del *pipeline* de STACKS se llevó a cabo en el superordenador FinisTerra-II del Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA, <https://www.cesga.es/>) utilizando la partición *thinnodes*.

Los *scripts*, tanto del *pipeline* como del módulo POPULATIONS que se emplearon se encuentran disponibles en el repositorio de GitHub: <https://github.com/elenabeade/iberolacerta>

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de calidad de las lecturas

En la Figura 3 se muestran algunos de los resultados de los parámetros de calidad para todas las muestras. Como vemos, para la calidad de las lecturas (*per sequence quality*), todas las muestras cumplen los estándares de calidad.

3.2. Preprocesamiento de las lecturas

Tras el filtrado de las lecturas que se llevó a cabo, se conservaron una media del 58,5% de las lecturas en bruto (desviación estándar de 11,9%).

3.3. Exploración del espacio paramétrico

En la Figura 4 se muestran los resultados de la exploración del espacio paramétrico. En ella se muestra el número de SNPs encontrados por locus para cada una de las combinaciones de parámetros. Como se ve, para pocos SNPs, son las combinaciones de M y n más bajas las que conducen a un mayor número de loci, sin embargo, al aumentar el

número de SNPs esto se revierte. Son las combinaciones que cuentan con los parámetros *var* y *gt* de 0,05 las que destacan en número de loci a partir de los 2 SNPs por locus. Por ello, se elige como óptima la combinación M2n1gt05var05 para llevar a cabo la ejecución de Stacks.

3.4. Resultados de Stacks

En el Anexo II se muestran los resultados por individuo de los 3 primeros pasos de STACKS. Tras la ejecución del *pipeline* se obtuvo un catálogo de un total de 230560 loci (CSTACKS), de los que se genotiparon 215293 (GSTACKS). El promedio de loci por individuo presente en el catálogo fue de 45959,4. Tras la ejecución de POPULATIONS, un total de 31545 loci pasaron los filtros, sobre los que se detectaron 23421 SNPs.

En la búsqueda de los loci con patrones de herencia diferentes (sexuales y mitocondriales), se encontraron un total de 1 locus mitocondrial, 5 ligados al W y 94 ligados al Z. Además, se mapearon en el cromosoma Z de *Podarcis* un total de 988 loci, entre los que se identificaron 48 que tenían un patrón de herencia autosómica (los restantes 940 se asumieron como ligados a Z). Así, para la comparación de las coberturas de estos loci se distinguió entre 4 grupos: aquellos identificados como Z y que mapearon en el cromosoma Z de *Podarcis* (66), aquellos identificados como Z pero que no mapearon en *Podarcis* (10), aquellos identificados como Z que mapearon en cromosomas autosómicos (18) y los identificados como autosómicos pero que mapearon en Z en *Podarcis* (48). En la Figura 5 vemos representada esta cobertura. Sí parece haber diferencias claras entre machos y hembras para todos aquellos que habíamos identificado como Z con el filtro, pero no así para los demás, por lo que estos últimos no se tomaron como ligados al Z.

Por su parte, la cobertura relativa para el locus identificado como mitocondrial fue de 0,56.

Combinadas estas evidencias se elaboró una *blacklist* o lista negra de 1040 loci, para que no se tuviesen en cuenta en el análisis poblacional. Así, tras excluir estos loci se volvió a ejecutar el módulo POPULATIONS, identificándose 22847 SNPs.

El resultado del FASTSTRUCTURE mostró una complejidad del modelo que maximiza la probabilidad de 2, es decir, que se estima que existen dos subpoblaciones. Además, la estructura poblacional se explica a partir de 3 componentes, lo que quiere decir que de todos los SNPs estudiados la variación observada se explica por 3 agrupaciones. En la figura 6 vemos la representación de los resultados obtenida con CLUMPACK. Los individuos están ordenados según su localización a lo largo del curso del río, mostrándose estas de forma ascendente. El código del Anexo I Código orden hace referencia a esta disposición. Los colores hacen referencia a los componentes de variación mencionados.

4. DISCUSIÓN

4.1. Espacio paramétrico

En vista de los resultados obtenidos en la exploración del espacio paramétrico, vemos que no existen grandes diferencias en el número de SNPs obtenidos entre los diferentes valores, siendo los parámetros de umbral *var* y *gt* los que

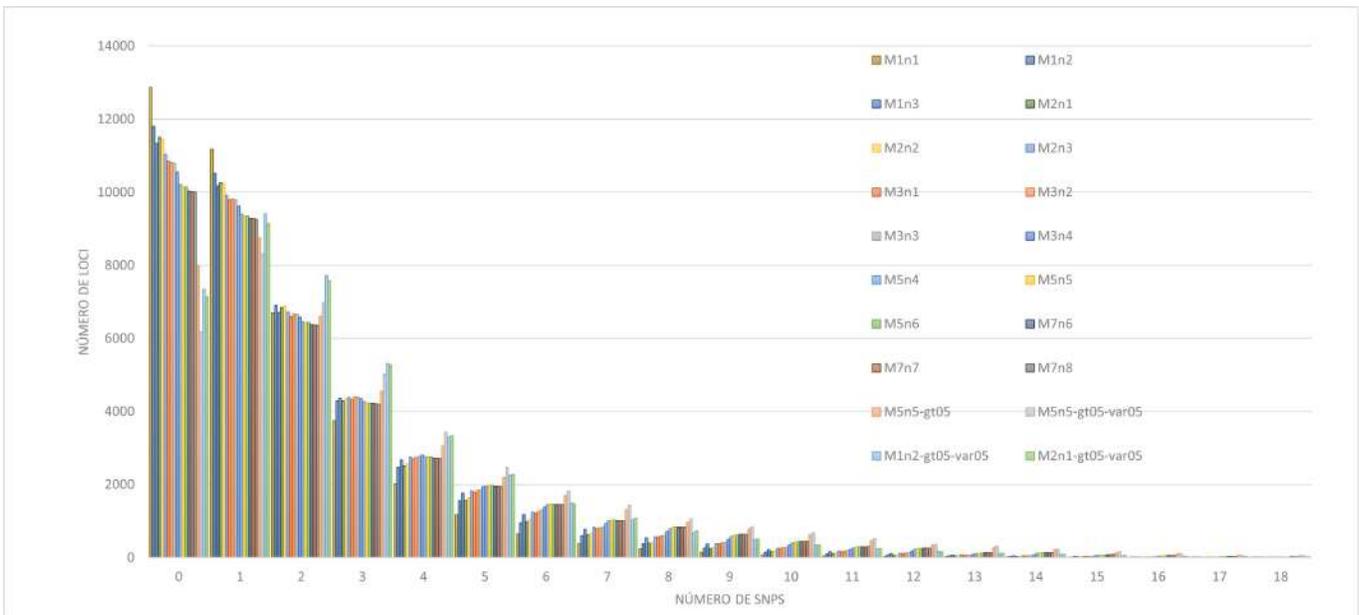


Figura 4. Resultados de la exploración del espacio paramétrico. Cada barra muestra el número de loci (Y) y el número de SNPs por locus (X) para cada combinación de valores paramétricos ensayada.

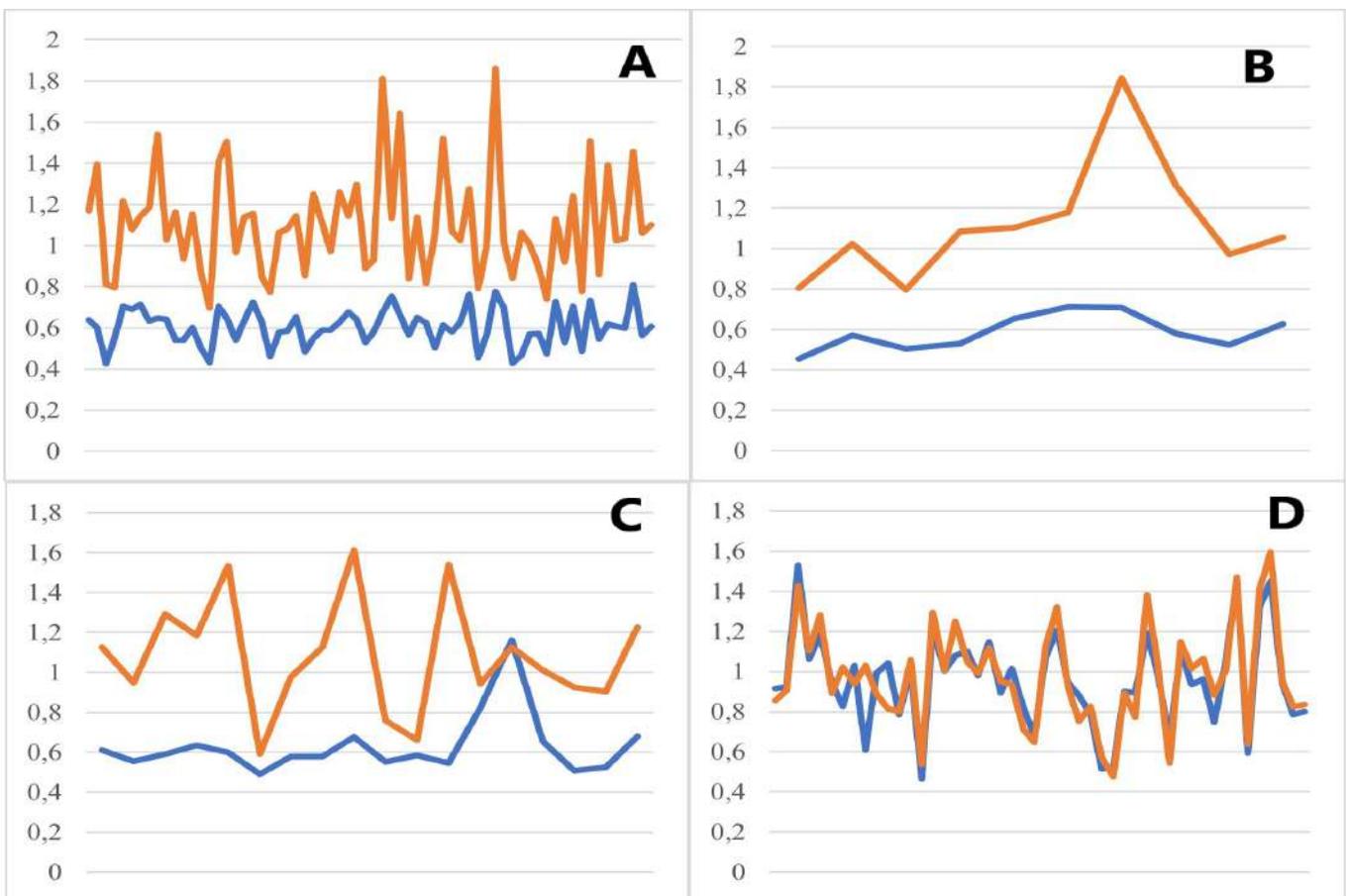


Figura 5. Coberturas relativas de los loci sospechosos de estar ligados a Z. Cada punto representa la cobertura para un locus relativa a la observada como promedio en una muestra de loci autosómicos. A) Loci identificados como Z y que mapearon en el cromosoma Z de *Podarcis*, B) loci identificados como Z pero que no mapearon en *Podarcis*, C) loci identificados como Z que mapearon en cromosomas autosómicos y D) los identificados como autosómicos pero que mapearon en Z en *Podarcis*. La línea naranja representa la cobertura para esos loci en machos y la azul para las hembras

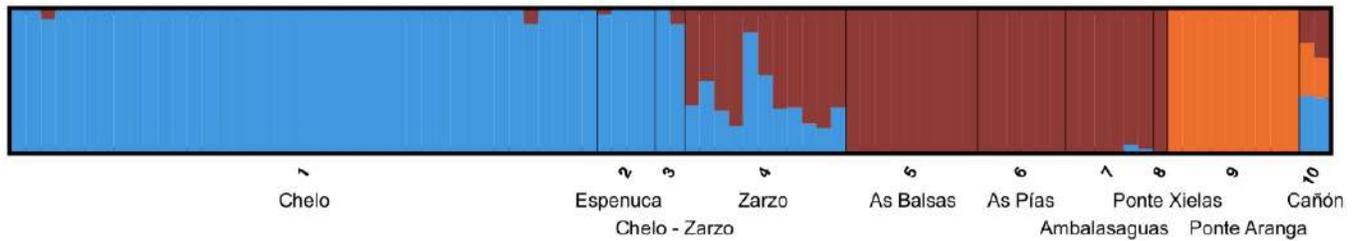


Figura 6. Resultado de Clumpack. Cada barra vertical representa a un individuo, que están ordenados según el curso ascendente del río, en el orden del código que aparece para cada individuo en el Anexo I (Código orden). Bajo el gráfico se señalan las zonas de muestreo, indicándose su nombre e ID siguiendo la Tabla 1. Los colores representan los componentes que explican la variación genética de la población

más diferencias marcan entre los diferentes modelos. Tal y como era de esperar, al aumentar el número de diferencias nucleóticas entre los loci que se incorporan al catálogo (n), el número total de loci disminuye. Lo mismo ocurre al aumentar el número de nucleótidos que separen a dos loci (M). El modelo con la combinación de parámetros finalmente seleccionados para la ejecución del *pipeline* es el valor por defecto que recomiendan los autores [30], lo que significa que la especie *Iberolacerta monticola* se ajusta al modelo general.

4.2. Resultados de Stacks

El número de loci en el catálogo obtenido por STACKS supone una estima del número de SINEs a lo largo del genoma que se han usado en la construcción de la genoteca de *Iberolacerta monticola* empleando el método *Mobiseq*. Puesto que el catálogo obtenido es de 230560 loci y cada individuo tiene del orden de 46000 loci presentes en el catálogo, esto quiere decir que se están muestreando aproximadamente una quinta parte de todos los loci que se podrían muestrear para cada individuo. Estas cifras son similares a las obtenidas con el método *RAD-Seq* [31], el más empleado para este tipo de estudios, que rondan los 200000-300000 loci por catálogo, y en torno a los 30000-60000 loci por individuo [32–34].

En cuanto a los resultados relativos a la variabilidad poblacional obtenidos por POPULATIONS, la cifra de 23000 SNPs es un número similar al empleado para otros estudios recientes de poblacionales en lacértidos [35, 36] en los que se ha empleado STACKS. Para otros estudios con lacértidos en los que se emplearon otros programas, los resultados fueron variables. Un estudio en el que se usó DARTSEQ se consiguieron del orden de 30000 SNPs, aunque con un ratio de genotipado del 70% [37]. Para otro estudio en el que se empleó el *pipeline* IPYRAD las cifras resultaron mucho más bajas, entre 2200 y 3500 SNPs [38]. Hay también que tener en cuenta que en el presente trabajo se obtuvo un número considerablemente alto de SNPs a pesar de que solo se seleccionó un SNP por locus (para tener solamente SNPs no ligados).

Por otro lado, el grado de variación que reflejan los SNP también va ligado a determinadas consideraciones relativas al organismo y la población de estudio, ya que podría estar correlacionado con el tamaño efectivo a largo plazo de la población [39].

4.3. Filtrado de loci

En cuanto a los resultados obtenidos del filtrado de loci sexuales y no nucleares, hay una serie de cuestiones a tener en cuenta.

En primer lugar, la identificación de un locus mitocondrial se trata de una anomalía, ya que lo esperado es que no hubiese ninguno. El elemento trasponible empleado en el método *MobiSeq* no está presente en el genoma mitocondrial, por lo que no se deberían haber obtenido lecturas de este genoma. Una posibilidad podría ser que se tratase de una inserción, sin embargo, esto no explicaría el patrón de herencia propio de un mitocondrial. Además, la cobertura resultó ser la propia de un locus ligado a un cromosoma hemiciogótico. La única explicación posible es que este locus esté asociado a un cromosoma B. Aunque no se ha encontrado un cromosoma de estas características en las preparaciones de tejidos en *Iberolacerta monticola* (el primero en reptiles se encontró en el año 2019), su presencia en organismos superiores parece ya confirmada para todas las especies [40].

Por otro lado, el número de loci ligados a W es mucho menor de lo que esperaríamos (teniendo en cuenta el tamaño de este cromosoma). Al tratarse de un cromosoma que no recombina, este es considerado un cementerio de elementos transponibles [41], pero esto no cuadra con el resultado. Una explicación podría ser que el elemento transponible que hemos empleado esté subrepresentado en este cromosoma. Puede no ser una inserción aleatoria y estar asociada al grado de compactación de la cromatina de unos y otros cromosomas (el W es fuertemente heterocromático), algo que muestran algunos SINE.

Respecto a los loci ligados al cromosoma Z, aunque se han encontrado en mayor cantidad, estos siguen siendo pocos, pero hay que tener en cuenta que los niveles de polimorfismo son más bajos para este cromosoma, por lo que pueden no alcanzar el mínimo fijado (0,01).

Además, hemos visto una serie de loci que a tenor de los resultados de cobertura, no han mantenido el ligamiento entre las dos especies (*I. monticola* y *P. muralis*), es decir, que algunos que están ligados a Z en una especie están ligados a un autosómico en la otra y viceversa. Esto quiere decir que existe dinamismo entre los cromosomas de estos lacértidos.

Por último, se ha observado que el resultado de POPULATIONS no se vio muy afectado al incorporar la lista negra con estos loci y se obtuvo un número similar de SNPs, es decir, que el grado de variación no estaba muy afectado por la

presencia de estos loci. Esta variación podría verse reflejada a nivel de individuo, pero no a nivel poblacional.

4.4. Estructura de la población

En cuanto a la estructura de la población obtenida representada en la figura 6, vemos que existen 3 elementos de variación que la conforman. Así, esto nos permite observar una clara barrera entre las poblaciones de Ponte Xielas y Ponte Aranga, es decir, entre el tramo inferior y el superior. Esta diferenciación era de esperar, pues estas localizaciones están separadas por hábitat inhóspito para la especie. Se trata de una separación muy antigua y que no tiene que ver con la acción del hombre. Además, dentro del tramo superior, la población de Aranga parece estar totalmente aislada, ya que no presenta variaciones presentes en otras poblaciones. Esto podría suponer un riesgo que llevase a la desaparición de esta subpoblación.

Por su parte, la subpoblación del cañón, a pesar de contar con solo dos individuos muestra la variación que está presente en el resto de subpoblaciones. Esto parece indicar que se trata de la población ancestral desde la que se inició el proceso de colonización aguas abajo en el curso del río. Además, los individuos presentes pueden considerarse como reservorio de variación genética.

Por otro lado, la variación aportada por los SNPs se ha mostrado útil no solo para poner de manifiesto la esperada diferenciación entre tramo superior y el resto del río, sino que también ha señalado una barrera críptica en la población de Zarzo. Así, esta localización marca una zona de transición entre el resto de puntos de muestreo que parecen estar aislados entre sí. De hecho, alguna de las poblaciones no muestran ningún grado de variación, lo que parece indicar que se encuentran totalmente aisladas. No hay explicación para esta barrera, por lo que lo más probable es que se deba a alteraciones del hábitat ocasionadas por el ser humano, lo que ha causado zonas de hábitat inadecuado que aíslan a estas subpoblaciones. Por tanto, puede tratarse de una barrera efímera y que puede ser corregida.

5. TRABAJO FUTURO

Se propone como trabajo futuro un análisis más exhaustivo de alguna de las poblaciones, como es la del Cañón, para lo que habría que contar con la captura de un mayor número de individuos. Además, se debe indagar en la barrera críptica destapada en la zona de Zarzo, sobre cuál puede ser su causa y a qué elementos del paisaje puede deberse.

REFERENCIAS

- [1] J. M. Catchen, A. Amores, P. Hohenlohe, W. Cresko, and J. H. Postlethwait, "Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences," *G3: Genes—genomes—genetics*, vol. 1, no. 3, pp. 171–182, 2011.
- [2] J. Catchen, P. A. Hohenlohe, S. Bassham, A. Amores, and W. A. Cresko, "Stacks: an analysis tool set for population genomics," *Molecular ecology*, vol. 22, no. 11, pp. 3124–3140, 2013.
- [3] N. C. Rochette, A. G. Rivera-Colón, and J. M. Catchen, "Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve radseq-based population genomics," *Molecular Ecology*, vol. 28, no. 21, pp. 4737–4754, 2019.
- [4] N. C. Rochette and J. M. Catchen, "Deriving genotypes from rad-seq short-read data using stacks," *Nature Protocols*, vol. 12, no. 12, pp. 2640–2659, 2017.
- [5] S. Kunvar, S. Czarnomska, C. Pertoldi, and M. Tokarska, "In search of species-specific snps in a non-model animal (european bison (*bison bonasus*))—comparison of de novo and reference-based integrated pipeline of stacks using genotyping-by-sequencing (gbs) data," *Animals*, vol. 11, no. 8, p. 2226, 2021.
- [6] N. Rodríguez-Ezpeleta, I. R. Bradbury, I. Mendibil, P. Álvarez, U. Cotano, and X. Irigoien, "Population structure of atlantic mackerel inferred from rad-seq-derived snp markers: Effects of sequence clustering parameters and hierarchical snp selection," *Molecular ecology resources*, vol. 16, no. 4, pp. 991–1001, 2016.
- [7] C. F. Graham, D. R. Boreham, R. G. Manzon, W. Stott, J. Y. Wilson, and C. M. Somers, "How "simple" methodological decisions affect interpretation of population structure based on reduced representation library dna sequencing: a case study using the lake whitefish," *PLoS One*, vol. 15, no. 1, p. e0226608, 2020.
- [8] D. Liu, L. Zhang, J. Wang, and Y. Ma, "Conservation genomics of a threatened rhododendron: Contrasting patterns of population structure revealed from neutral and selected snps," *Frontiers in genetics*, vol. 11, 2020.
- [9] N. Díaz-Arce and N. Rodríguez-Ezpeleta, "Selecting rad-seq data analysis parameters for population genetics: the more the better?" *Frontiers in genetics*, vol. 10, p. 533, 2019.
- [10] L. Benestan, J. S. Moore, B. J. Sutherland, J. Le Luyer, H. Maaroufi, C. Rougeux, E. Normandeau, N. Rycroft, J. Atema, L. N. Harris *et al.*, "Sex matters in massive parallel sequencing: Evidence for biases in genetic parameter estimation and investigation of sex determination systems," *Molecular Ecology*, vol. 26, no. 24, pp. 6767–6783, 2017.
- [11] J. Catchen, "When structure leads to sex: Untangling signals in population genetic data sets," *Molecular Ecology*, vol. 26, pp. 6763–6766, 2017.
- [12] J. M. Catchen, P. A. Hohenlohe, L. Bernatchez, W. C. Funk, K. R. Andrews, and F. W. Allendorf, "Unbroken: Radseq remains a powerful tool for understanding the genetics of adaptation in natural populations," *Molecular ecology resources*, vol. 17, no. 3, pp. 362–365, 2017.
- [13] M. Van Wyngaarden, P. V. Snelgrove, C. DiBacco, L. C. Hamilton, N. Rodríguez-Ezpeleta, N. W. Jeffery, R. R. Stanley, and I. R. Bradbury, "Identifying patterns of dispersal, connectivity and selection in the sea scallop, *placopecten magellanicus*, using rad seq-derived snps," *Evolutionary Applications*, vol. 10, no. 1, pp. 102–117, 2017.
- [14] S. Sherpa, D. Rioux, C. Pougnet-Lagarde, and L. Després, "Genetic diversity and distribution differ between long-established and recently introduced populations in the invasive mosquito *aedes albopictus*," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 58, pp. 145–156, 2018.

- [15] M. J. González-Serna, P. J. Cordero, and J. Ortego, "Using high-throughput sequencing to investigate the factors structuring genomic variation of a mediterranean grasshopper of great conservation concern," *Scientific reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2018.
- [16] R. H. Toczydlowski and D. M. Waller, "Drift happens: Molecular genetic diversity and differentiation among populations of jewelweed (*impatiens capensis* meerb.) reflect fragmentation of floodplain forests," *Molecular ecology*, vol. 28, no. 10, pp. 2459–2475, 2019.
- [17] X. de Galicia, "Decreto 88 / 2007 do 19 de abril, polo que se regula o catálogo galego de especies ameazadas. consellería de medio ambiente e desenvolvemento sostible," *Diario Oficial de Galicia*, no. 89, pp. 7409–7423, 2007.
- [18] P. Galan, "Distribución de iberolacerta monticola en la provincia de a coruña (galicia, noroeste de españa). supervivencia de un relicto climático," *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, vol. 23, no. 1, pp. 81–87, 2012.
- [19] P. Galán, *Conservacion de la herpetofauna gallega*. Universidade da Coruña, Servicio de Publicacións, 1999.
- [20] A. Rey-Iglesia, S. Gopalakrishan, C. Carøe, D. E. Alquezar-Planas, A. Ahlmann Nielsen, T. Röder, L. Bruhn Pedersen, C. Næsborg-Nielsen, M.-H. S. Sinding, M. Fredensborg Rath *et al.*, "Mobiseq: De novo snp discovery in model and non-model species through sequencing the flanking region of transposable elements," *Molecular ecology resources*, vol. 19, no. 2, pp. 512–525, 2019.
- [21] S. Andrews, "Fastqc. a quality control tool for high throughput sequence data," 2010.
- [22] P. Ewels, M. Magnusson, S. Lundin, and M. Käller, "Multiqc: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report," *Bioinformatics*, vol. 32, no. 19, pp. 3047–3048, 2016.
- [23] B. Bushnell, "Bbmap: a fast, accurate, splice-aware aligner," Lawrence Berkeley National Lab.(LBNL), Berkeley, CA (United States), Tech. Rep., 2014.
- [24] A. M. Bolger, M. Lohse, and B. Usadel, "Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data," *Bioinformatics*, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120, 2014.
- [25] M. Martin, "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads," *EMBnet. journal*, vol. 17, no. 1, pp. 10–12, 2011.
- [26] J. Mendes, D. J. Harris, S. Carranza, and D. Salvi, "Evaluating the phylogenetic signal limit from mitogenomes, slow evolving nuclear genes, and the concatenation approach. new insights into the lacertini radiation using fast evolving nuclear genes and species trees," *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 100, pp. 254–267, 2016.
- [27] H. Li and R. Durbin, "Fast and accurate short read alignment with burrows–wheeler transform," *bioinformatics*, vol. 25, no. 14, pp. 1754–1760, 2009.
- [28] A. Raj, M. Stephens, and J. K. Pritchard, "faststructure: variational inference of population structure in large snp data sets," *Genetics*, vol. 197, no. 2, pp. 573–589, 2014.
- [29] N. M. Kopelman, J. Mayzel, M. Jakobsson, N. A. Rosenberg, and I. Mayrose, "Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across k," *Molecular ecology resources*, vol. 15, no. 5, pp. 1179–1191, 2015.
- [30] J. R. Paris, J. R. Stevens, and J. M. Catchen, "Lost in parameter space: a road map for stacks," *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 8, no. 10, pp. 1360–1373, 2017.
- [31] J. W. Davey and M. L. Blaxter, "Radseq: next-generation population genetics," *Briefings in functional genomics*, vol. 9, no. 5-6, pp. 416–423, 2010.
- [32] N. Wang, M. Thomson, W. J. Bodles, R. M. Crawford, H. V. Hunt, A. W. Featherstone, J. Pellicer, and R. J. Buggs, "Genome sequence of dwarf birch (*Betula nana*) and cross-species rad markers," *Molecular Ecology*, vol. 22, no. 11, pp. 3098–3111, 2013.
- [33] N. Díaz-Arce, H. Arrizabalaga, H. Murua, X. Irigoien, and N. Rodríguez-Ezpeleta, "Rad-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas," *Molecular phylogenetics and evolution*, vol. 102, pp. 202–207, 2016.
- [34] M. Crotti, C. E. Adams, and K. R. Elmer, "Population genomic snps from epigenetic rads: Gaining genetic and epigenetic data from a single established next-generation sequencing approach," *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 11, no. 7, pp. 839–849, 2020.
- [35] G. Caeiro-Dias, A. Brelford, A. Kaliotzopoulou, M. Meneses-Ribeiro, P.-A. Crochet, and C. Pinho, "Variable levels of introgression between the endangered *Podarcis carbonelli* and highly divergent congeneric species," *Heredity*, vol. 126, no. 3, pp. 463–476, 2021.
- [36] N. M. Bouzid, J. W. Archie, R. A. Anderson, J. A. Grummer, and A. D. Leaché, "Evidence for ephemeral ring species formation during the diversification history of western fence lizards (*Sceloporus occidentalis*)," *Molecular Ecology*, 2021.
- [37] J. Melville, M. L. Haines, K. Boysen, L. Hodgkinson, A. Kilian, K. L. Smith Date, D. A. Potvin, and K. M. Parris, "Identifying hybridization and admixture using snps: application of the dartseq platform in phylogeographic research on vertebrates," *Royal Society open science*, vol. 4, no. 7, p. 161061, 2017.
- [38] P. Kornilios, E. Thanou, P. Lymberakis, Ç. Ilgaz, Y. Kumlutaş, and A. Leaché, "A phylogenomic resolution for the taxonomy of aegean green lizards," *Zoologica Scripta*, vol. 49, no. 1, pp. 14–27, 2020.
- [39] M. Husemann, F. Zachos, R. Paxton, and J. Habel, "Effective population size in ecology and evolution," *Heredity*, vol. 117, no. 4, pp. 191–192, 2016.
- [40] I. G. Kichigin, A. P. Lisachov, M. Giovannotti, A. I. Makunin, M. R. Kabilov, P. C. O'Brien, M. A. Ferguson-Smith, A. S. Graphodatsky, and V. A. Trifonov, "First report on b chromosome content in a reptilian species: The case of *Anolis carolinensis*," *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 294, no. 1, pp. 13–21, 2019.
- [41] W. Traut, "Sex chromosome evolution: evidence from fish, fly and moth species," in *Chromosomes today*. Springer, 2004, pp. 73–82.

ANEXOS

Anexo I. Individuos capturados

Código Individuo	Sexo	Código Zona	Zona	Tramo	Código orden
Ib_58638	M	9	Aranga	Superior	80
Ib_58650	H	1	Chelo	Inferior	2
Ib_58655	M	1	Chelo	Inferior	3
Ib_58659	H	1	Chelo	Inferior	4
Ib_58706	H	1	Chelo	Inferior	5
Ib_58710	H	1	Chelo	Inferior	6
Ib_58714	H	1	Chelo	Inferior	7
Ib_58717	H	1	Chelo	Inferior	8
Ib_58718	H	1	Chelo	Inferior	9
Ib_68684	H	1	Chelo	Inferior	10
Ib_68688	H	1	Chelo	Inferior	11
Ib_68698	M	1	Chelo	Inferior	12
Ib_68713	H	1	Chelo	Inferior	13
Ib_68734	H	1	Chelo	Inferior	14
Ib_68738	H	1	Chelo	Inferior	15
Ib_68766	M	1	Chelo	Inferior	16
Ib_68781	H	1	Chelo	Inferior	17
Ib_68783	H	1	Chelo	Inferior	18
Ib_68795	M	1	Chelo	Inferior	19
Ib_68801	M	1	Chelo	Inferior	20
Ib_8632	M	5	As Balsas	Inferior	58
Ib_8633	H	7	Ambaslasaugas	Inferior	73
Ib_8639	H	7	Ambaslasaugas	Inferior	74
Ib_8640	M	4	Zarzo	Inferior	47
Ib_8642	M	6	As Pías	Inferior	67
Ib_8648	H	8	Ponte Xielas	Inferior	79
Ib_8658	M	1	Chelo	Inferior	1
Ib_8663	M	2	Espenuca	Inferior	41
Ib_8667	H	2	Espenuca	Inferior	42
Ib_8670	H	10	Cañón	Superior	89
Ib_8671	M	4	Zarzo	Inferior	48
Ib_8674	H	1	Chelo	Inferior	21
Ib_8676-1	H	1	Chelo	Inferior	81
Ib_8676-2	H	9	Aranga	Superior	34
Ib_8677	H	1	Chelo	Inferior	23
Ib_8679	H	1	Chelo	Inferior	24
Ib_8680	M	1	Chelo	Inferior	25
Ib_8682-1	H	1	Chelo	Inferior	26
Ib_8682-2	M	9	Aranga	Superior	37
Ib_8683	H	5	As Balsas	Inferior	59
Ib_8685	H	1	Chelo	Inferior	27
Ib_8686	M	1	Chelo	Inferior	28
Ib_8687	H	7	Ambaslasaugas	Inferior	75
Ib_8688	M	1	Chelo	Inferior	29
Ib_8689-1	H	1	Chelo	Inferior	30
Ib_8689-2	H	6	As Pías	Inferior	68
Ib_8690	H	4	Zarzo	Inferior	49
Ib_8693-1	M	1	Chelo	Inferior	31
Ib_8693-2	H	9	Aranga	Superior	83
Ib_8694	M	4	Zarzo	Inferior	50
Ib_8696	M	9	Aranga	Superior	84
Ib_8699-2	H	5	As Balsas	Inferior	60
Ib_8699-1	H	1	Chelo	Inferior	32
Ib_8700-1	H	1	Chelo	Inferior	33
Ib_8700-2	M	9	Aranga	Superior	85
Ib_8701-1	H	1	Chelo	Inferior	34

Ib_8701-2	M	3	Chelo-Zarzo	Inferior	45
Ib_8702	M	9	Aranga	Superior	86
Ib_8716-2	H	5	As Balsas	Inferior	69
Ib_8721	M	5	As Balsas	Inferior	61
Ib_8722	M	7	Ambaslasaugas	Inferior	76
Ib_8723	H	9	Aranga	Superior	87
Ib_8737	M	4	Zarzo	Inferior	51
Ib_8742	H	6	As Pías	Inferior	70
Ib_8748	H	10	Cañón	Superior	90
Ib_8750	M	1	Chelo	Inferior	35
Ib_8755	H	6	As Pías	Inferior	71
Ib_8762	M	1	Chelo	Inferior	36
Ib_8763	M	5	As Balsas	Inferior	62
Ib_8765	H	5	As Balsas	Inferior	63
Ib_8777	H	1	Chelo	Inferior	37
Ib_8778	H	3	Chelo-Zarzo	Inferior	46
Ib_8788	H	9	Aranga	Superior	88
Ib_8794	H	4	Zarzo	Inferior	52
Ib_8807	M	4	Zarzo	Inferior	53
Ib_8809	H	5	As Balsas	Inferior	64
Ib_8813	M	6	As Pías	Inferior	72
Ib_8703	M	1	Chelo	Inferior	38
Ib_8704	H	1	Chelo	Inferior	39
Ib_8705	H	1	Chelo	Inferior	40
Ib_8707	H	4	Zarzo	Inferior	54
Ib_8709-1	H	4	Zarzo	Inferior	44
Ib_8711	H	2	Espenuca	Inferior	43
Ib_8712	M	5	As Balsas	Inferior	65
Ib_8713	H	4	Zarzo	Inferior	56
Ib_8714	H	4	Zarzo	Inferior	57
Ib_8715orig	H	7	Ambaslasaugas	Inferior	77
Ib_8716-1	H	2	Espenuca	Inferior	66
Ib_8729	H	7	Ambaslasaugas	Inferior	78
Ib_8709-2	M	2	Espenuca	Inferior	55

Anexo II. Resultados de Stacks por individuo

Individuo	Lecturas	ustacks			cstacks		sstacks
		Loci ensamblados	Cobertura media	SD Cobertura	Loci encontrados en el catálogo	Loci añadidos al catálogo	Loci presentes en el catálogo
Ib_58638	1155088	59967	16,68	8,56		58060	50390
Ib_58650	936742	54435	14,24	8,45	28586	9668	45001
Ib_58655	1521126	60666	22,58	11,6	31238	5776	51548
Ib_58659	1589407	60555	23,93	13,15	29224	3849	51678
Ib_58706	508552	30882	12,29	7,87	12461	2918	25103
Ib_58710	780922	49666	12,89	7,82	19531	4182	40889
Ib_58714	1667015	62039	23,8	12,45	24233	3151	52330
Ib_58717	1552515	61639	22,48	11,8	22259	2435	52243
Ib_58718	825737	49204	13,47	8,52	14257	4945	39052
Ib_68684	1640905	60741	24,37	12,58	19099	1638	52036
Ib_68688	1108457	59482	16,13	8,92	16325	2765	49772
Ib_68698	1322348	59228	20,14	10,08	15645	1297	51112
Ib_68713	1345065	59189	20,45	11,15	14671	1444	51105
Ib_68734	1106894	59481	16,15	8,42	13573	1958	50356
Ib_68738	1574213	61183	23,16	12,12	13638	1654	52076
Ib_68766	1046364	58371	15,43	8,53	11298	2642	48657
Ib_68781	1536927	60425	23,1	11,97	11474	1262	51562
Ib_68783	1411123	59045	21,48	11,31	10136	1130	50981
Ib_68795	1078679	60281	15,56	8,37	9785	2597	50312
Ib_68801	1104316	57094	17,27	8,21	8522	811	50070
Ib_8632	983856	56461	14,81	8,94	8240	4041	45641
Ib_8633	1198399	62278	16,73	9,4	9315	3332	51147
Ib_8639	977455	56411	14,5	7,25	7495	969	49305
Ib_8640	1245452	59396	18,82	9,77	8205	1188	51188
Ib_8642	1436753	60199	21,74	11,24	8276	1361	51468
Ib_8648	1181827	58469	18,08	9,16	7407	1033	50678
Ib_8658	1235224	60867	17,82	9,43	7758	1191	51356
Ib_8663	1385831	60083	20,87	10,53	6763	2815	47381
Ib_8667	948915	57125	14,12	8,39	5646	1731	46758
Ib_8670	789860	54756	12,09	6,19	3777	3637	26328
Ib_8671	734835	54101	11,13	5,66	7506	1358	50988
Ib_8674	676945	34524	15,34	10,08	2893	2985	21167
Ib_8676-1	1468050	60377	21,69	11,23	2228	2548	15856
Ib_8676-2	977761	57863	14,16	7,3	7264	2085	51374
Ib_8677	609554	27959	16,69	11,23	6573	1542	51730
Ib_8679	548532	21597	20,04	14,99	5662	813	50808
Ib_8680	1375600	61567	19,54	10,2	5218	849	50483
Ib_8682-1	1360377	61085	19,5	10,08	7645	3827	52135
Ib_8682-2	1667911	65122	22,21	12,61	3712	3448	30937
Ib_8683	1349184	58546	21,14	10,6	3313	2816	29374
Ib_8685	1130184	57894	17,14	8,64	5819	1297	51662
Ib_8686	1482643	65674	19,77	11,4	5180	969	50837
Ib_8687	666158	39383	12,89	8,57	7198	2232	52282
Ib_8688	662026	36844	13,78	8,73	5646	1839	51572
Ib_8689-1	1238063	60771	17,86	9,17	6783	2325	52348
Ib_8689-2	1180047	58602	17,88	9,2	5292	3887	47509
Ib_8690	1588526	63745	21,93	11,93	1449	1276	16549
Ib_8693-1	1364034	61636	19,67	10,47	5554	1420	52020
Ib_8693-2	508240	25115	15,53	10,18	5430	1381	51673
Ib_8694	1592117	63928	21,98	11,78	3698	834	47868
Ib_8696	1392333	58595	21,15	10,56	5559	1731	51946
Ib_8699-2	400905	20053	13,1	8,15	3564	3836	30270
Ib_8699-1	1000334	59353	14,14	8,55	4365	2291	46153
Ib_8700-1	1461034	61604	21,16	11,18	5123	1581	51648
Ib_8700-2	563720	44954	10	5,01	3926	2436	42854
Ib_8701-1	1474461	60975	21,54	11,23	4132	1581	48089

Ib_8701-2	874710	54191	13,65	6,65	4538	1966	48792
Ib_8702	1399357	62134	19,36	10,45	4474	1065	51197
Ib_8716-2	1116575	61461	15,8	8,53	3173	2142	36663
Ib_8721	1209553	60416	17,28	10,04	5439	1933	51896
Ib_8722	1194618	59460	17,76	8,9	3796	720	51070
Ib_8723	1321376	59197	19,64	10,13	4269	1338	50741
Ib_8737	1679703	63618	23,61	12,46	4919	1830	51599
Ib_8742	1030733	59351	14,97	7,82	4853	2738	49492
Ib_8748	1430711	58129	22,45	11,89	4293	1163	50953
Ib_8750	589881	40687	11,21	6,47	3429	779	50107
Ib_8755	1156797	60034	16,74	8,72	5494	1767	52610
Ib_8762	1485068	62270	21,55	11,22	4218	1513	50502
Ib_8763	1164442	58321	17,77	8,8	2805	1761	34167
Ib_8765	1098511	59553	15,52	8,25	4489	1382	51085
Ib_8777	1538611	61600	22,72	12,07	4842	1447	52408
Ib_8778	1138879	58466	16,84	9,28	3421	824	50806
Ib_8788	1218020	56061	19,8	10,02	4386	1780	50111
Ib_8794	1188083	60907	17,17	9,68	4275	1103	52545
Ib_8807	1289544	60354	19,07	9,68	4022	1859	49224
Ib_8809	1055015	57262	16,24	8,08	4201	2192	50657
Ib_8813	1509715	62510	21,68	11,48	4049	1038	51812
Ib_8703	1453959	62225	20,79	10,92	3004	751	50405
Ib_8704	823619	39875	16,67	11,23	4952	1571	52156
Ib_8705	867596	55269	13,05	7,52	4295	1886	50836
Ib_8707	1148480	60867	16,42	8,62	3026	1272	47811
Ib_8709-1	869403	51851	13,98	8,71	4557	1741	49393
Ib_8711	933316	57958	13,69	7,61	7409	2618	51932
Ib_8712	1327803	59822	19,79	10,01	1983	1698	20225
Ib_8713	597013	43625	10,34	6,47	4325	1317	50065
Ib_8714	1351323	62519	19,03	10,38	2195	534	40650
Ib_8715orig	1303801	58446	20,2	10,26	6242	2174	50502
Ib_8716-1	1206908	59376	18,01	9,28	4696	1075	50458
Ib_8729	1080363	57385	16,37	8,31	3040	742	51007
Ib_8709-2	879164	56486	13,45	7,28	2823	552	49817
