

ORIGINAL

Intrapopulational genic variation of the giant African Snail (*Achatina fulica*) in the Valle del Cauca

Variación génica intrapoblacional del caracol gigante africano (*Achatina fulica*) en el Valle del Cauca

Angie Patiño-Montoya^{1*} B.Sc, Alan Giraldo¹ Ph.D.

¹Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Grupo de Investigación en Ecología Animal, Calle 13#100-00, Cali, Colombia. *Correspondencia: angie.patino@correounivalle.edu.co, ecologia.animal@correounivalle.edu.co

Received: July 2016; Accepted: January 2017.

ABSTRACT

Objective. To evaluate the intrapopulation genetic variation of *A. fulica* in the Valle del Cauca. **Materials and methods.** Ten microsatellite loci from specimens collected at eight municipalities in the Valle del Cauca Department were amplified. Allelic frequencies and descriptors of intrapopulation genetic diversity were estimated. Bayesian analysis was used to estimate the number of groups present in the study area. **Results.** Two groups were identified in the Valle del Cauca ($p > 50\%$): one group comprised individuals from the north and center of the department, and one group comprised individuals from the south and west of the department. These groups were genetically different from each other ($F_{ST} 0.16$; $p < 0.05$). Isolation by distance was confirmed (Mantel $p 0.01$; $R^2 0.06$), and a high level of endogamy was detected through a deficit of heterozygotes in the evaluated loci ($F_{IS} 0.45$). **Conclusions.** We suggest that the *A. fulica* population present in the Valle del Cauca could have been introduced at more than one location, or that there could have been more than one wave of invasion. The high level of endogamy is probably the result of control activities that eliminated adult individuals in the population, which has led to an enhanced founder effect.

Keywords: Endogamy, invasive species, population genetics, *Mollusca* (Source: CAB).

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la variación genética intrapoblacional de *A. fulica* en el Valle del Cauca. **Materiales y métodos.** Se amplificaron diez loci microsatélites de muestras obtenidas en ocho municipios del Departamento. Se estimaron las frecuencias alélicas y descriptores de la diversidad genética intrapoblacional y se discriminó mediante un análisis bayesiano la cantidad de agrupaciones presentes en la zona de estudio. **Resultados.** Se identificaron dos agrupaciones en el Valle del Cauca ($p > 50\%$): una conformada por los individuos de los municipios del Norte y Centro, otra por los municipios del Sur y Occidente. Estas agrupaciones, fueron genéticamente diferentes ($F_{ST} 0.16$; $p < 0.05$), confirmándose además aislamiento por distancia (Mantel $p 0.01$; $R^2 0.06$) y un alto nivel de endogamia a partir del déficit de heterocigotos en los loci evaluados ($F_{IS} 0.45$). **Conclusiones.** Se sugiere que la población de *A. fulica* en el Valle del Cauca pudo tener más de un lugar de introducción o incluso más de una oleada de invasión. Además, el alto nivel de endogamia probablemente es el resultado de las actividades de control, las cuales eliminan individuos adultos de la población lo que conlleva al incremento de la deriva *per se* del efecto fundador.

Palabras clave: Endogamia, especies invasoras, genética de poblaciones, mollusca (Fuente: CAB).

INTRODUCTION

The giant African snail *Achatina fulica* (Bowdich 1822) is a gastropod mollusk from the Achatinidae family, characterized by having a conical light-to dark-brown shell, with a distinctive banding pattern. Adults reach up to 30 cm in size (1). They are considered protandric hermaphrodites (they develop the masculine sex first). Giant African snails reach sexual maturity at five months, and under optimal conditions of temperature, humidity, and food availability, can oviposit hundreds of eggs (1-5).

Attributes such as having a high fertility rate and few habitat requirements, being a superior competitor easily transported by humans, and being economically attractive, placed the African snail as one of the 100 most dangerous invasive species worldwide (6-9). Since its departure from its natural distribution range in Africa 200 years ago, this species has caused a wide variety of environmental damage and public health issues because it is an intermediary host in the life cycle of several parasitic species, such as nematodes of the *Angiostrongylus* genus, which cause death in humans from eosinophilic meningitis. Furthermore, this species can lead to significant economic losses by affecting agricultural crops and requiring high investments to implement management, control and eradication measures (1,9,10). These direct and indirect impacts of *A. fulica* on human health and the economy of the regions, have provided the impetus for research into the ecology, physiology and genetics of this mollusk, to obtain the necessary tools to strengthen management plans and propose integrated exploitation measures for this species (9-10).

The first record of *A. fulica* in Latin America occurred in Brazil during the decade of the 1980s where it was introduced for heliculture. Until the present time this species has been recorded in Cuba, Venezuela, Argentina, Paraguay, Ecuador, Peru, and Colombia (1,3-5). According to Resolution 0848 of 2008 by the Ministry of Environment, Housing, and Land Development, *A. fulica* is considered an exotic invasive species in Colombia. This resolution establishes the responsibilities and general guidelines of response of the environmental institutions faced with this threat, and defines a "national inter-institutional plan of the environmental, agriculture and livestock, health and defense sectors for the management, prevention, and control of the giant African snail (*A. fulica*)" (3,11,12).

INTRODUCCIÓN

El caracol gigante africano *Achatina fulica* (Bowdich 1822) es un molusco gasterópodo de la familia Achatinidae, que se caracteriza por una concha cónica de color café claro a café oscuro con un patrón de bandas característico, alcanzando un tamaño de adulto de hasta 30 cm (1). Sexualmente se consideran hermafroditas protándricos (desarrollan primero el sexo masculino), alcanzan la madurez sexual a los cinco meses y en condiciones óptimas de temperatura, humedad y disponibilidad de alimento pueden colocar ovoposiciones con centenares de huevos (1-5).

Atributos como la alta tasa reproductiva, pocos requerimientos de hábitat, ser un competidor superior y tener una alta facilidad de transporte por el ser humano, posicionaron al caracol africano como una de las 100 especies invasoras más peligrosas a nivel mundial (6-9). Desde su salida del rango natural de distribución en África hace 200 años, esta especie ha ocasionado una gran variedad de daños ambientales y de salud pública al ser hospedero intermediario de diferentes especies parásitas como los nematodos del género *Angiostrongylus*, los cuales ocasionan muertes por meningitis eosinofílica. Además, esta especie puede llegar a provocar importantes pérdidas económicas al afectar cultivos agrícolas y requerir altas inversiones para implementar las medidas de manejo, control y erradicación (1,9,10). Estos impactos directos e indirectos de *A. fulica* sobre la salud humana y la economía de las regiones que invade han sido el principal motor para la investigación a nivel ecológico, fisiológico y genético del molusco, con el fin de obtener las herramientas necesarias para fortalecer los planes de manejo e incluso poder proponer medidas de aprovechamiento integrado de la especie (9-11).

En Latinoamérica, el primer reporte de *A. fulica* fue en Brasil durante la década de 1980, lugar al que fue llevado por propósitos de helicultura. Hasta la fecha se ha confirmado la presencia de esta especie en Cuba, Venezuela, Argentina, Paraguay, Ecuador, Perú y Colombia (1,3-5). De acuerdo con la Resolución 0848 del 2008 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, *A. fulica* se considera una especie exótica invasora en Colombia. Esta resolución establece las responsabilidades y lineamientos generales de respuesta de las entidades ambientales ante esta amenaza, y define el "Plan nacional interinstitucional del sector ambiental, agropecuario, salud y defensa, para el manejo, prevención y control del caracol gigante africano (*A. fulica*)" (3,11,12).

The current hypothesis is that there was a sole point of entry into Colombia from Brazil, as according to De la Ossa-Lacayo et al (3), the first report of this species in Colombia was given by Corpoamazonia in 2010. In the next five years, the giant African snail was reported in over half of the country. The first official record of the giant African snail in Valle del Cauca Department occurred in 2011. Several control efforts have been carried out since its appearance, and some biological and ecological studies have been undertaken since 2013 (3,11).

Likemost other invasive species (13-15), the giant African snail shows low genetic diversity compared with the populations in its natural distribution range in Africa, due to a founder effect that occurs at each introduction event, and to the bottlenecks that occur after establishment and acclimation to the conditions of the new habitat (1,4). Although from the ecological point of view *A. fulica* populations can be considered successful at their initial invasion stages, the population dynamics tend to stabilize or even decay naturally several decades after the invasion (1, 15). Several hypotheses have been postulated to explain this phenomenon, including genetic causes, phenotypic plasticity, behavioral causes, or multiple introductions that compensate the genetic drift suffered by the founding individuals (14, 15).

Several studies of giant African snail population genetics have been carried out over large spatial scales (> 500 km) (1, 4). However, there is a lack of information on genetic variability of these populations at regional scales, and on the genetics of giant African snail populations in locations where invasion is recent. Taking into account that the giant African snail has been present in the Valle del Cauca Department for less than five years and that the geographical size of this region is in the order of 200 km, in this study we used microsatellite molecular markers (11, 16) to establish the intrapopulation genetic diversity of *A. fulica* at a regional scale.

MATERIALS AND METHODS.

Study area. Considering the strong association of *A. fulica* with urban centers, the specimens used in the present study were obtained from the cities of Buenaventura (3°53' N, 77° 05' W), Bugalagrande (4°12' N, 76°18' W), Cali (3°26' N, 76°31' W), Cartago (4°44' N, 75°54' W), Jamundí (3°15' N, 76°32' W), Palmira (3°31' N, 76°81' W), Tuluá (4°05' N, 76°12' W), and Buga (3°54'07' N, 76°18'4' W)(Figure 1) during a study of African Snail's population and reproductive ecology in the Valle del Cauca (11). The city

Actualmente, para el país se maneja la hipótesis de un único origen de introducción desde Brasil, ya que de acuerdo con De la Ossa-Lacayo et al (3), el primer reporte de esta especie en Colombia fue dado por Corpoamazonia en el año de 2010. Desde entonces, en menos de cinco años se reportó la presencia del caracol en más de la mitad del territorio nacional, y para el departamento del Valle del Cauca el primer registro oficial de esta especie se remonta al 2011, habiéndose adelantado varios esfuerzos de control desde su aparición y algunos estudios biológicos y ecológicos desde el año 2013 (3,11).

El caracol africano como especie invasora, presenta a nivel genético el mismo comportamiento que las demás especies invasoras (13-15): una baja en la diversidad génica respecto a las poblaciones en su rango natural de distribución en África, debido al efecto fundador que ocurre en cada evento de introducción, y a los cuellos de botella subsiguientes al establecimiento y aclimatación a las condiciones del nuevo hábitat (1,4). Aunque desde el punto de vista ecológico las poblaciones de *A. fulica* en las etapas iniciales de invasión pueden considerarse exitosas, cuando la invasión lleva varias décadas la dinámica poblacional tiende a estabilizarse o incluso puede llegar a decaer de forma natural (1,15). Para explicar este fenómeno se han formulado varias hipótesis, desde causas genómicas, de amplia plasticidad fenotípica, comportamentales o múltiples introducciones que compensan la deriva génica en la que entran los individuos fundadores (14,15).



Figure 1. Geographic location of giant African snail *Achatina fulica* sample plots in the Valle del Cauca Department.

of Buenaventura is located within the Chocó biogeographic region, at a mean 7 m above sea level. The vegetation is typical of very humid tropical forest. The mean annual precipitation is 7650 mm per year, the mean relative humidity is 89%, and the annual mean temperature is between 25°C and 28°C. The remaining cities are located in the geographic valley of the Cauca River. The dominant vegetation is dry tropical forest; it has a flat topography, mean elevation of 1000m, annual mean precipitation of 900 mm, and average temperature of 23.6°C (17).

Field work. The sampling protocol carried out in the population and reproductive study of *A. fulica* consisted in delimiting the search area of African snails in three sectors, randomly selected, of each city. To identify the sampling sectors, each urban perimeter was divided into 2 km² cells, and then randomly select three cells. Within each cell, three sampling plots of 16 m² were located and all the African snails detected were harvested. These sampling plots corresponded to urban green areas, road separators or abandoned lots, where plant material, building debris or garbage was accumulated.

Individuals were collected manually, following the sanitary recommendations provided by the environmental authority (12), stored in individual zip-lock bags, and transported to zoology laboratory at Universidad del Valle in Cali. After measuring and weighing each captured snail, 20 individuals from each city, were randomly selected to remove 30 mg of foot tissue using a sterilized surgical blades. Tissue samples were deposited at 96% ethanol in 1.5 mL eppendorf tubes and stored at -20°C. Biological waste was disposed following guidelines stated in Resolution 654 of 2011 of the Ministry of Environment, Housing and Land Development of Colombia (12).

Laboratory Methods. DNA extraction was performed using the protocol of Fontanilla (1) and the recommendations of the protocols of the commercial houses ThermoScientific® and Qiagen®. 30 µL of proteinase K and RNAase were added to 20 mg of chopped tissue for at least 5 hours of lysis in water bath at 55 ° C, for a final extraction reaction volume of 200 µL. The 10 Microsatellite loci (GENBANK KM104170-KM104179) were amplified under the concentrations and reaction conditions proposed by Morrison et al (16). Equal concentrations (0.5 µM) of primer forward and primer reverse were used, and DNA was diluted to a concentration of 20 ng/µL. The amplification was verified using electrophoresis in 10% polyacrylamide gels (8.75 mL of polyacrylamide solution 2X; 26.25

para el caracol africano, realizados a gran escala espacial (>500 km) (1,4). En términos generales, se carece de información sobre la variabilidad genética de estas poblaciones en una escala regional y más aún de información sobre las poblaciones del caracol africano en lugares donde la invasión ha sido reciente. Considerando que la presencia del caracol africano en el Valle del Cauca es menor a 5 años y que la extensión geográfica de esta región es del orden de los 200 km (11), en este trabajo de investigación se utilizaron microsátélites como marcador molecular (16), para establecer la diversidad genética intrapoblacional en una escala regional de *A. fulica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. Considerando la fuerte asociación de *A. fulica* con los centros urbanos, los especímenes utilizados en el presente estudio fueron recolectados en las ciudades de Buenaventura (3°53'N, y 77°05'W), Bugalagrande (4°12' N, y 76°18' W), Cali (3°26' N, y 76°31' W), Cartago (4°44' N, y 75°54' W), Jamundí (3°15' N, y 76°32' W), Palmira (3°31' N, y 76°81' W), Tuluá (4°05' N, y 76°12' W) y Buga (3°54'07' N, y 76°18'4' W) (Figura 1), durante el desarrollo de un estudio de ecología poblacional y reproductiva de Caracol Africano en el Valle del Cauca (11). La ciudad de Buenaventura se encuentra dentro de la Región del Chocó Biogeográfico, con un promedio de 7 m sobre el nivel del mar, presenta una vegetación de bosque muy lluvioso tropical, el promedio de precipitación anual es de 7650 mm al año, su humedad relativa promedio es del 89% y su temperatura media anual se encuentra entre los 25°C y los 28°C. Las otras siete ciudades se localizaron a lo largo del valle geográfico del río Cauca, en donde la vegetación predominante corresponde a bosque seco tropical, la topografía es plana, la elevación promedio de 1000 m sobre el nivel del mar, la precipitación anual es del orden de 900 mm y la temperatura media de 23.6°C (17).

Métodos de campo. El protocolo de muestreo desarrollado en el estudio poblacional y reproductivo de *A. fulica* consistió en delimitar el área de búsqueda de caracoles africanos en tres sectores de cada ciudad, seleccionados de manera aleatoria. Para identificar los sectores de muestreo, cada perímetro urbano fue dividido en celdas de 2 Km², de las cuales se seleccionaron tres de manera aleatoria. Al interior de cada celda, se ubicaron tres parcelas de muestreo de 16 m², en donde todos los especímenes de caracol africano detectados fueron recolectados. Estas parcelas de muestreo correspondieron a zonas verdes urbanas, separadores viales o lotes

mL of TBE 1X; 300 μ L of ammonium persulfate, and 30 μ L of TEMED), with a 10 min pre-run at 50V, and a three hour run at 180V.

To continue with the molecular analysis, the samples from each city were assigned to four geographical zones: zone 1 or Pacific zone contained the samples of Buenaventura, zone 2 or Center zone contained the samples of Buga, Tulua and Bugalagrande, zone 3 or North zone contained the samples of Cartago, and zone 4 or South zone contained the samples of Cali, Palmira, Jamundí. Eight samples of randomly pre-amplified DNA were selected for each zone and displayed in gel using silver nitrate staining and two weight markers, one of 100 base pairs long and other one of 25 base pairs long Generuler ThermoScientific®. Gels were photographed and edited in Photoshop®, and genotyped using the ImageJ® program.

Ethical aspects. As the giant African snail has been declared an exotic invasive species, no permits were required from environmental authorities. The safety guidelines dictated by the Ministry of Environment were followed (12).

Statistical analyses. In order to stablish the possible clusters in the population and their possible coincidence with the geographic delimitations established for this research, we used the Bayesian algorithm from the Geneland package of the R program (18), based on the genotype databases and the geographic coordinates of the sampled plots. This algorithm infers and locates genetic discontinuities between populations, obtaining geospatial plots of the posteriori distribution probability using kriging interpolation techniques (18). A null alleles model was run with one million iterations, of which 1% were retained and 20% were discarded as burn-in. Based on the information obtained with geospatial distribution plots, the allelic frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium were calculated for the groups and for the population, as well as genetic diversity and polymorphism estimators such as effective number of alleles (E_a), mean number of alleles (N_a), percentage of polymorphic loci, effective number of migrants (N_m), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), fixation index (F), genetic identity, and Nei's genetic distance (D). A Mantel test was performed using the obtained matrix of distances of the plot geographic coordinates, and the matrix of genetic distances. These tests were performed using the GeneALEX v.6.502® program (19). The F_{ST} and F_{IS} statistics and null allele frequencies were calculated using the Geneland program; significance was established through a molecular variance analysis (AMOVA).

abandonados, en donde el material vegetal, los desechos de construcción o la basura estaba acumulada

Los especímenes fueron recolectados manualmente siguiendo las recomendaciones de salubridad de la autoridad ambiental (12), guardados en bolsas sella fácil individuales y transportados al laboratorio de Zoología de la Universidad del Valle, en Cali. Después de medir y pesar cada caracol recolectado, fueron seleccionaron aleatoriamente 20 individuos de cada ciudad para obtener 30 mg de tejido del pie utilizando cuchillas quirúrgicas esterilizadas. Las muestras de tejido fue depositadas en tubos eppendorf de 1.5 mL con etanol al 96% para su conservación a -20°C . Los residuos biológicos fueron dispuestos siguiendo los lineamientos de la resolución 654 del 2011 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (12).

Métodos de laboratorio. La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo de Fontanilla (1) y las recomendaciones de las casas comerciales ThermoScientific® y Qiagen®. Se utilizó 20 mg de tejido picado, al cual se le adicionó 30 μ L de proteinasa K y RNAasa, con un mínimo de 5 horas de lisado en baño María a 55°C , con 200 μ L como volumen final de reacción de extracción. Los 10 loci microsatélites (GENBANK KM104170-KM104179) se amplificaron bajo las concentraciones y condiciones de reacción de Morrison et al (16), igualándose la concentración del Primer forward a la del Primer reverse (0.5 μM) y con el ADN diluido a una concentración de 20 ng/ μ L. Se verificaron los amplificadores mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (8.75 mL de solución de poliacrilamida 2X; 26.25 mL de TBE 1X; 300 μ L de persulfato de amonio y 30 μ L de TEMED) con una precorrida de 10 min a 50V y una corrida de tres horas a 180V.

Para continuar con el análisis molecular, las muestras de cada ciudad fueron asignadas a cuatro zonas geográficas: la zona 1 o zona Pacífico contuvo las muestras de Buenaventura, la zona 2 o zona Centro contuvo las muestras de Buga, Tulua y Bugalagrande, la zona 3 o zona Norte contuvo las muestras de Cartago, y la zona 4 o zona Sur contuvo las muestras de Cali, Palmira, Jamundí. Se seleccionaron para cada zona ocho muestras del ADN previamente amplificado de manera aleatoria y se procedió a realizar una visualización en gel usando tinción de nitrato de plata y dos marcadores de peso, uno de 100 pares base y otro de 25 pares base Generuler ThermoScientific®. Los geles fueron fotografiados y editados en Adobe Photoshop®, y genotipados digitalmente con el programa ImageJ®.

RESULTS

Eighty percent of loci were polymorphic. The Aful012 locus was not present in the sampled individuals, and the Aful030 locus was monomorphic. The Bayesian analysis defined two aggregations for the evaluated samples with a probability density higher than 50%, indicating that the giant African snail in the Valle del Cauca Department comprises two groups. The assignation probability was 96% (Table 1).

Table 1. *A posteriori* assignation probability of giant African snail (*A. fulica*) individuals to the Southern (South) and Northern (North) groups in the Valle del Cauca Department.

Zone	Individual	Probability	
		South	North
Pacific	1	0.96	0.04
	2	0.96	0.04
	3	0.96	0.04
	4	0.96	0.04
	5	0.96	0.04
	6	0.96	0.04
	7	0.96	0.04
	8	0.96	0.04
Center	9	0.04	0.96
	10	0.04	0.96
	11	0.04	0.96
	12	0.03	0.96
	13	0.04	0.96
	14	0.04	0.96
	15	0.05	0.95
	16	0.04	0.96
North	17	0.04	0.96
	18	0.04	0.96
	19	0.04	0.96
	20	0.04	0.96
	21	0.04	0.96
	22	0.04	0.96
South	23	0.04	0.96
	24	0.96	0.04
	25	0.96	0.04
	26	0.96	0.04
	27	0.96	0.04
	28	0.95	0.04
	29	0.57	0.04
	30	0.96	0.04
	31	0.96	0.04
	32	0.96	0.04

Aspectos éticos. Al ser el caracol gigante africano una especie declarada como exótica invasora, no se requieren permisos de ninguna autoridad ambiental. Por otro lado, se siguieron las normativas de seguridad dictadas por el Ministerio de Ambiente (12).

Análisis estadísticos. Con el fin de establecer las posibles agrupaciones dentro de la población en la zona de estudio y su coincidencia con la delimitación geográfica establecida para esta investigación, se utilizó el algoritmo bayesiano del paquete Geneland del programa R (18), a partir de la información obtenida de los genotipos y las coordenadas geográficas de las parcelas de muestreo. Este algoritmo infiere y localiza discontinuidades genéticas entre poblaciones, obteniendo una representación geoespacial de la probabilidad de distribución *a posteriori* utilizando la técnica de interpolación de *kriging* (18).

Se corrieron un millón de iteraciones guardándose el 1%, un burning del 20% y teniendo en cuenta el modelo de alelos nulos. De acuerdo a la información obtenida en los mapas de distribución, se calcularon para las agrupaciones y la población, las frecuencias alélicas, el equilibrio Hardy-Weinberg, al igual que los estimadores de diversidad génica y del polimorfismo de número de alelos efectivos (A_e), número de alelos promedio (N_a), porcentaje de loci polimórficos, número de migrantes efectivos (N_m), heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e), índice de fijación (F), la identidad y la distancia genética de Nei (D). Con la matriz de distancias geográficas obtenidas de las coordenadas geográficas de las parcelas y la matriz de distancias genéticas se realizó una prueba de Mantel. Todo lo anterior utilizando el programa GeneALEX v.6.502® (19).

Los estadísticos F_{ST} , F_{IS} y la frecuencia de alelos nulos se calcularon con el paquete Geneland, cuya significancia se estableció por un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).

RESULTADOS

El 80% de loci fueron polimórficos, pues el locus Aful012 no se encontró presente en los individuos muestreados y el locus Aful030 fue monomórfico. Con una densidad de probabilidad superior al 50%, el análisis bayesiano definió dos agregaciones para las muestras evaluadas, indicando que la especie en el Valle del Cauca estaría conformada por dos agrupaciones. Con probabilidades de asignación del 96% (Tabla 1), la primera agrupación la conformaron las ciudades de Buenaventura, Cali, Palmira, Jamundí, ubicadas en la zona Pacífico y zona Sur del área de estudio (Figura 2), conformando las ciudades de la zona centro y

The first (Southern) group comprised cities in the west and south of the department: Buenaventura, Cali, Palmira, and Jamundí (Figure 2). The second (Northern) group comprised cities in the north and center of the department: Cartago, Buga, Tuluá, and Bugalagrande (Figure 3). Of the eight polymorphic loci, the Aful032 locus had less allelic bands than the base pairs recorded in a previous study, and it was monomorphic in the Southern population. The locus with the highest number of alleles was Aful069 with five alleles, followed by Aful061 with four alleles, and Aful086 with three alleles. The northern group had a higher frequency of unique alleles than the southern group (Table 2). The approximate effective number of alleles was conserved in the groups as well as in the population. The mean values of observed heterozygosity were lower than the expected values, except for the loci Aful082 and Aful086 loci, which had negative fixation index values, contrary to the Aful080 locus that had the highest statistical value, indicating a heterozygote deficit in most loci (Table 3).

The frequency of null alleles in *A. fulica* specimens in Valle del Cauca was 0.3, with four loci with an effective number of migrants above four, which would indicate high genetic flow for those loci, especially for Aful082 and Aful086. On the other hand, the χ^2 test showed that Aful080, Aful069, Aful086, and Aful061 were not in Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.05$) (Table 4). This was probably due to extreme N_m values and a heterozygote deficit revealed by the significant ($p < 0.05$) F_{IS} values, which suggests that there

zona norte, Cartago, Buga, Tuluá y Bugalagrande, la segunda agrupación (Figura 3).

Dentro de los ocho loci polimórficos, se reportó para el locus Aful032 bandas alélicas por debajo de los pares de base registrados hasta el momento, siendo monomórfico para la agrupación del Sur. El locus con mayor número de alelos fue el Aful069 con cinco seguido por el Aful061 con cuatro y el Aful086 con tres, donde la agrupación norte cuenta con mayor frecuencia de alelos únicos que la agrupación del sur (Tabla 2). La cantidad aproximada de alelos efectivos se conservó tanto en las agrupaciones como en la población; por otro lado, los valores promedio de heterocigosidad observada son menores que los valores esperados, excepto para los loci Aful082 y Aful086 que a su vez son los que cuentan con los valores negativos del índice de fijación, contrario al locus Aful080 que posee el valor más alto del estadístico. Esto sugiere un déficit de heterocigotos en la mayoría de los loci (Tabla 3).

La frecuencia de alelos nulos en los especímenes de *A. fulica* en el Valle del Cauca fue de 0.3; con cuatro loci con un número de migrantes efectivos por encima de cuatro, lo que indicaría un alto flujo génico para esos loci, especialmente Aful082 y Aful086. Por otra parte, la prueba de bondad de ajuste χ^2 determinó que los loci Aful080, Aful069, Aful086, Aful061 no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg ($p < 0.05$) (Tabla 4), probablemente por los valores extremos de N_m y la deficiencia de heterocigotos soportada por los valores significativos ($p < 0.05$) de F_{IS} , lo que

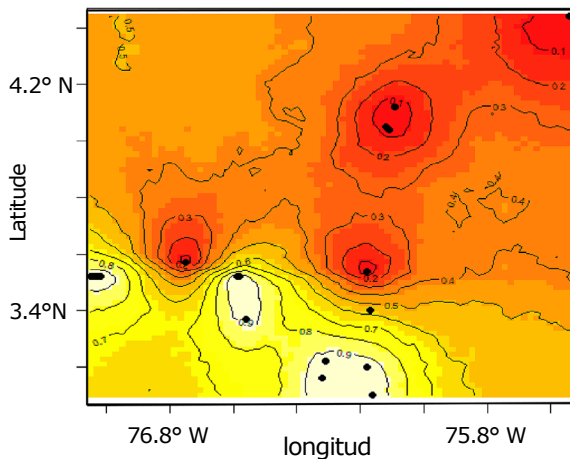


Figure 2. A *posteriori* probability distribution map of the first *Achatina fulica* group in the Valle del Cauca Department. The axes represent the geographic coordinates of Department. The probability values (0.0 to 1.0), when the yellow color means higher values of probability than red color. The isolines delimit the probability.

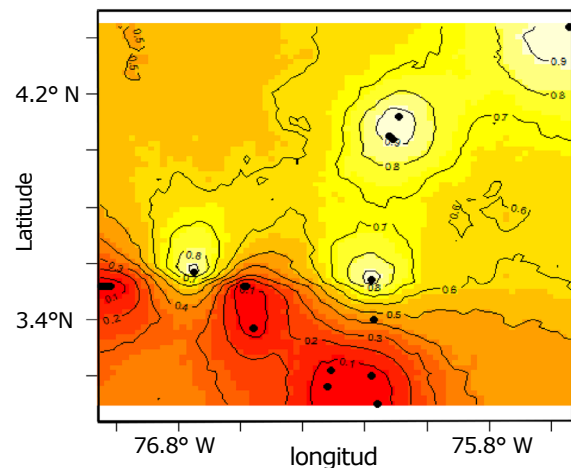


Figure 3. A *posteriori* probability distribution map of the second *Achatina fulica* group in the Valle del Cauca Department. The axes represent the geographic coordinates of Department. The probability values (0.0 to 1.0), when the yellow color means higher values of probability than red color. The isolines delimit the probability.

Table 2. Allelic frequencies of the nine evaluated loci of the giant African snail population in the Valle del Cauca Department. South: southern group, North: northern group, Total: Valle del Cauca, n: Number of samples.

Locus	Allele (pb)	Total	South	North
Aful080	n	22	11	11
	120	0.614	0.455	0.773
	124	0.386	0.545	0.227
Aful069	n	30	14	16
	132	0.300	0.643	0.000
	140	0.433	0.214	0.625
	144	0.033	0.000	0.063
	180	0.033	0.000	0.063
	199	0.200	0.143	0.250
Aful082	n	28	16	12
	104	0.911	0.938	0.875
	108	0.089	0.063	0.125
Aful098	n	29	15	14
	120	0.914	0.967	0.857
	124	0.086	0.033	0.143
Aful086	n	29	15	14
	120	0.552	0.567	0.536
	124	0.241	0.200	0.286
	132	0.207	0.233	0.179
Aful030	n	32	16	16
	190	1.000	1.000	1.000
Aful032	n	28	16	12
	175	0.821	1.000	0.583
	180	0.179	0.000	0.417
Aful061	n	28	15	13
	155	0.179	0.167	0.192
	160	0.375	0.133	0.654
	170	0.107	0.067	0.154
	175	0.339	0.633	0.000
Aful025	n	28	15	13
	175	0.732	0.800	0.654
	180	0.268	0.200	0.346
Unique alleles			0.222	0.333

was non-random pairing within the groups that comprise the population. A significant moderate genetic differentiation was detected between the northern and southern groups (F_{ST} 0.163; $p < 0.05$) due to isolation by distance revealed by the Mantel test (p 0.01; R^2 0.06), and there was a slight difference inferred from the genetic identity value (0.841) (Table 5).

Table 3. Intrapopulation genetic diversity of the southern (South), northern (North) and total population of *A. fulica* in the Valle del Cauca Department. Number of samples (N), Number of alleles (Na), Effective number of alleles (Ne), Observed heterozygosity (Ho), Expected heterozygosity (He), Fixation index (F), with respective mean and standard deviation (SD) (NA: not applicable).

Group	Locus	N	Na	Ae	Ho	He	F	
South	Aful080	11	2	1.984	0.182	0.496	0.633	
	Aful069	14	3	2.085	0.357	0.520	0.314	
	Aful082	16	2	1.133	0.125	0.117	-0.067	
	Aful098	15	2	1.069	0.067	0.064	-0.034	
	Aful086	15	3	2.406	0.600	0.584	-0.027	
	Aful030	16	1	1.000	0.000	0.000	NA	
	Aful032	16	1	1.000	0.000	0.000	NA	
	Aful061	15	4	2.217	0.333	0.549	0.393	
	Aful025	15	2	1.471	0.267	0.320	0.167	
	promedio	15	2	1.596	0.215	0.295	0.197	
	DE	0,52	0	0.192	0.065	0.083	0.088	
	North	Aful080	11	2	1.541	0.091	0.351	0.741
		Aful069	16	4	2.169	0.500	0.539	0.072
		Aful082	12	2	1.280	0.250	0.219	-0.143
		Aful098	14	2	1.324	0.143	0.245	0.417
Aful086		14	3	2.497	0.643	0.599	-0.072	
Aful030		16	1	1.000	0.000	0.000	NA	
Aful032		12	2	1.946	0.500	0.486	-0.029	
Aful061		13	3	2.048	0.692	0.512	-0.353	
Aful025		13	2	1.827	0.385	0.453	0.150	
mean		14,1	2	1.667	0.29	0.336	0.144	
DE		0,41	0	0.123	0.054	0.052	0.071	
Total		Aful080	22	2	1.902	0.136	0.474	0.712
		Aful069	30	5	3.125	0.433	0.680	0.363
		Aful082	28	2	1.194	0.179	0.163	-0.098
		Aful098	29	2	1.187	0.103	0.158	0.343
	Aful086	29	3	2.466	0.621	0.595	-0.044	
	Aful030	32	1	1.000	0.000	0.000	NA	
	Aful032	28	2	1.415	0.214	0.293	0.270	
	Aful061	28	4	3.343	0.500	0.701	0.287	
	Aful025	28	2	1.645	0.321	0.392	0.180	
	mean	28.222	2.556	1.920	0.279	0.384	0.252	
	DE	0.894	0.412	0.289	0.068	0.083	0.084	

sugiere apareamiento no aleatorio dentro de las agrupaciones que conforman la población. Por último, existe una diferenciación genética moderada significativa entre las agrupaciones norte y sur del departamento (F_{ST} 0.163; $p < 0.05$), debida al aislamiento por distancia sustentada por la prueba de mantel (p 0.01; R^2 0.06), además de una leve diferencia inferida por el valor de identidad genética (0.841) (Tabla 5).

Table 4. Null allele frequency ((F(An)), effective number of migrants (Nm), chi-squared value (χ^2), and *p* value for the Hardy-Weinberg (HW) equilibrium test for the *A. fulica* population in the Valle del Cauca Department, **p*<0.05, ****p*>0.01.

Locus	F(An)	Nm	χ^2 HW	HW
Aful080	0,29	2.092	11.166	0.0008***
Aful069	0,13	0.881	19.509	0.03*
Aful082	0,18	21.500	0.269	0.604
Aful098	0,20	6.447	3.420	0.064
Aful086	0,14	52.369	8.473	0.03*
Aful032	0,17	0.700	2.035	0.154
Aful061	0,14	0.780	30.983	0.00002***
Aful025	0,19	9.043	0.912	0.340

DISCUSSION

Microsatellites have been widely used in population genetics as molecular markers, as they allow the estimation of levels of genetic variability within populations, and of genetic diversity, among other advantages. These molecular markers have been used to elucidate the genetic state of populations and their demographic history, as they are in most cases "neutral" markers and have a high degree of polymorphism (20).

In the case of the giant African snail, the degree of polymorphism reported by Morrison et al (2014) was higher for all loci compared with this study, due to the monomorphism and lack of one locus in this study (16). This is a reflection of the scale used in the two studies. Although the sample size was similar, the samples used by Morrison et al (2014) (16) came from countries in different continents, whereas in the present study the scale was regional, and the described loci had not yet been recorded in individuals from Latin America. However, taking into account that *A. fulica* is an invasive species, we would expect that polymorphism would decrease with decreasing geographic scale due to the high endogamy levels that are usually found in this species populations (1, 20, 21).

According to official records the giant African snail was introduced six years ago for commercial purposes into the Valle del Cauca Department (3, 11). Taking into account that under the assumption of microsatellite neutrality genetic diversity patterns are determined basically by the interaction of genetic flow and genetic drift (20), the moderate differentiation (F_{ST} 0.16) of the population in two groups could have occurred due to the species being introduced at more than one location, in this case in the north and south-west

Table 5. Wright's F statistics (F_{ST} - F_{IS}), Genetic Identity and Nei's genetic distance (1972) (I, D) for the giant African snail *Achatina fulica* in the Valle del Cauca Department, +South, ++North.

F_{ST}	F_{IS}	I	D
0,163	0.475+	0.841	0.173
	0.456++		

DISCUSIÓN

Los microsatélites como marcador molecular han sido ampliamente utilizados en estudios de genética poblacional, ya que permiten estimar los niveles de variabilidad génica dentro de las poblaciones, realizar estimaciones de la diversidad genética, entre otras ventajas. Estos marcadores moleculares se han usado para dilucidar el estado génico de la población, al igual que su historia demográfica al ser un marcador en la mayor parte de los casos "neutral" y a su alto grado de polimorfismo (20).

En el caso del Caracol Gigante Africano, el polimorfismo registrado por Morrison et al (16) es mayor para todos los loci respecto a lo encontrado en este estudio, por el monomorfismo y la ausencia de un locus. Lo anterior es el reflejo de la escala utilizada en ambos estudios, pues aunque se mantiene un tamaño de muestra similar, las muestras utilizadas en el estudio anterior (16) provienen de países en continentes diferentes, mientras que la escala en el presente trabajo es regional, además de que los loci descritos aún no habían sido registrados en individuos de Latinoamérica. Sin embargo, considerando la naturaleza de *A. fulica* como especie invasora, es de esperar que el polimorfismo del marcador disminuya con la escala geográfica debido a los altos niveles de endogamia en el que suelen encontrarse sus poblaciones (1, 20, 21).

En el departamento del Valle del Cauca, la población del caracol Africano cuenta con seis años según los registros oficiales, siendo introducido por propósitos netamente comerciales (3, 11). Según lo anterior, y teniendo en cuenta que bajo el supuesto de neutralidad de los microsatélites, los patrones de diversidad genética son determinados básicamente por la interacción del flujo genético y la deriva genética (20). La diferenciación moderada (F_{ST} 0.16) de la población en dos agrupaciones se puede producir por más de un lugar de introducción, probablemente desde el norte y desde el sur-occidente del departamento. Esta hipótesis es sustentada en función de la posición del Valle del Cauca, como región de encuentro comercial del sur-occidente Colombiano. Por el occidente, mercancías que provienen de Asia arriban a Buenaventura y

of the department. This hypothesis is supported by the position of the Valle del Cauca, as a region of commercial encounter of the southwestern Colombian. To Buenaventura arrived goods and perishables from Asia, and this stuff are transported by truck or train to the interior of the Valle del Cauca (22, 23). This route could be functioning as a dispersal path for the African snail into the Valle del Cauca. By the south, the African snail could be entering into Valle del Cauca associated with the agricultural products that are transported from the departments of Cauca and Nariño to the interior of the Country (11). On the other hand, the African snail also could be entering by the North of the Valle del Cauca associated to the agricultural transport coming from the department of Tolima and the coffee field of Risaralda, Caldas or Quindío (22, 23). Both situations could be promoting small scale intrapopulation genetic structure of *A. fulica* described in this study for the Valle del Cauca Department.

Multiple spatial and temporal origins are part of a demographic hypothesis to explain the paradox of invasive species, as a way to offset the deleterious effects of genetic drift from bottleneck and founder effects that are produced at the beginning of biological invasions (14, 15, 16, 20). This deleterious effects tend to produce slight differences in the populations of invasive species, and particularly seems to be true for *A. fulica*, since genetic studies carried out in populations of this species, where the introduction occurred more than 50 years ago, are obtained similar results to our work (1, 4). Therefore, to understand the dynamics of invasion it is important to know the demographic history with as much detail as possible.

The demographic history of *A. fulica* in Colombia is still controversial, since there is a chronological lag in the records of the occurrence of this species in the different geographical areas of the country. However, this situation could be indicating that *A. fulica* arrive to Colombia in different moments and by different points of entry. In less than two years, since the first formal technical report of presence of *A. fulica* in Colombia was carried out by Corpoamazonia, the African snail was recorded in more than half of the national territory. Moreover, this species was recorded in Santander Department the same year in which it was reported in the Valle del Cauca Department, even though these two departments are separated by over 700 km and by the Andes mountains (3, 11, 24). This situation makes even more probable intrapopulation genetic differentiation at the regional scale, such as was described in this study.

son transportados por camiones o por tren hacia el interior del Valle del Cauca (22, 23), ruta que podría estar funcionando como un camino de dispersión para el Caracol Africano. Por el sur, el Caracol Africano podría estar ingresando asociado a los productos agrícolas que son transportados desde los departamentos de Cauca y Nariño hacia el interior del País (11). Por otro lado, el Caracol Africano también podría estar ingresando por el Norte del Valle del Cauca asociado al transporte agrícola proveniente del departamento de Tolima y el eje Cafetero (22). Ambos condicionantes estarían promoviendo la estructura genética intrapoblacional de pequeña escala descrita en esta investigación para *A. fulica* en el Valle del Cauca.

Los orígenes múltiples, tanto espaciales como temporales, son parte de la hipótesis demográfica que se plantea para explicar la paradoja de las especies invasoras, como una forma de contrarrestar los efectos deletéreos de la deriva génica asociados con el impacto de los cuellos de botella y efecto fundador que se producen en el comienzo de las invasiones biológicas (14-16, 20). Estos efectos deletéreos, tienden a producir leves diferenciaciones en las poblaciones de especies invasoras, y particularmente parece ser cierto para *A. fulica*, ya que en estudios genéticos realizados en poblaciones de esta especie donde la introducción ha ocurrido hace más de 50 años se registran valores similares a los obtenidos en este trabajo (1,4). Por lo tanto, para comprender la dinámica de la invasión es importante conocer la historia demográfica con la mayor precisión posible.

La historia demográfica del *A. fulica* en Colombia aun es controversial, ya que hay un desfase cronológico en los registros de ocurrencia de esta especie en las diferentes zonas geográficas del País. Sin embargo, esta situación podría estar indicando que *A. fulica* llegó a Colombia en diferentes momentos y por diferentes puntos de ingreso. En menos de dos años, desde el primer reporte técnico formal de presencia de *A. fulica* en Colombia realizado por Corpoamazonia, se registró el caracol africano en más de la mitad del territorio nacional. Además, en Santander se registró esta especie en el mismo año en que fue reportada en el Valle del Cauca, departamentos que se encuentran separados por más de 700 km y la cordillera de los Andes (3,11,24). Esta situación, incluso hace más probable el desarrollo de diferenciación genética intrapoblacional en una escala regional, como la abordada en el presente estudio.

Por otro lado, la endogamia (F_{IS} 0.4) y la identidad genética (0.84) establecida, podría ser el resultado de un proceso reciente de invasión. Teóricamente los animales que entraron juveniles aún podrían estar vivos, al igual que la primera generación

The endogamy (F_{IS} 0.4) and high genetic identity (0.84) recorded in this study could be the result of a recent invasion process. Theoretically animals that arrived as juveniles could still be alive at the same time as the first generation born in the study zone. The founder effect should therefore still be acting on the population. However, if multiple temporal introductions had not occurred and the generation time was short, the polymorphism of the marker would have been lost over subsequent generations. The population controls that are carried out continuously in the Valle del Cauca Department have eliminated a high proportion of adult individuals (11), which probably led the population to face a bottleneck, increasing endogamy and genetic identity (15, 20).

In conclusion, it is probable that the giant African snail population of the Valle del Cauca Department had more than one point of introduction according to the two groups observed. As it is an invasive species that has been a short time in the study area, the population and detected groups exhibit high endogamy, modulated by the founder effect and possible multiple introductions. However, the control actions carried out by environmental authorities have probably exposed the *A. fulica* population in the Valle del Cauca Department to a bottleneck effect, which could have led to moderate differentiation between groups. The intrapopulation genetic characteristics of *A. fulica* in the Valle del Cauca Department coincide with what has been described for invasive species, where high endogamy, high genetic identity, violation of the Hardy-Weinberg equilibrium, and extreme values of the fixation index have been reported (1, 20, 21). Alleles tend to be fixed in some loci, and in others there could possibly be an excess of heterozygotes as evidence of the multiple introductions (1, 20).

The results of our research, open a new research line which seeks to apply molecular techniques to improve our knowledge about invasive species. Probably, the use of other molecular markers or techniques of analysis such as capillary electrophoresis or sequencing, should be explored in the future.

Acknowledgments

To Wilmar Bolívar, Ángela María González, Rodrigo Lozano, Natalia Rivera, Fernando Díaz and Mario F. Garcés for their contribution in different stages of the investigation. To the laboratory of Molecular Biology and Human Molecular Genetics of the Universidad del Valle. This study was co-financed by CVC and Univalle (agreement 054/2014).

nacida en la zona de estudio. Por lo tanto, el efecto fundador aún debería estar presente en la población. Aunque, si no hubieran ocurrido múltiples introducciones temporales y un tiempo de generación corto, el polimorfismo del marcador se habría perdido en las subsiguientes generaciones (20). Además, los controles poblacionales que se realizan continuamente en el Valle del Cauca, han eliminado una alta proporción de los individuos adultos (11), lo que probablemente llevó a la población a enfrentar un efecto de cuello de botella, aumentando la endogamia y la identidad genética (15,20).

En conclusión, es probable que la población del caracol africano en el departamento del Valle del Cauca tuviese más de un origen de introducción de acuerdo a las dos agrupaciones que se observaron. Por otro lado, al ser una especie invasora con un corto tiempo en la zona de estudio, la población y las agrupaciones establecidas exhiben alta endogamia, la cual estaría siendo modulada por el efecto fundador y las posibles múltiples introducciones. Sin embargo, las acciones de control realizadas por la autoridad ambiental, probablemente han expuesto a la población de *A. fulica* en el Valle del Cauca al efecto de cuello de botella, lo que podría conllevar a una diferenciación moderada entre agrupaciones. Por último, las características genéticas intrapoblacionales de *A. fulica* en el Valle del Cauca, concuerdan con lo descrito para especies invasoras, en donde se ha reportado alta endogamia, alta identidad genética, violación del equilibrio HW y valores extremos del índice de fijación (1,20,21). Incluso, en algunos loci se tienden a fijar alelos y en otros existiría posiblemente un exceso de heterocigotos, lo cual sería evidencia de las múltiples introducciones (1,20).

Nuestros resultados abren una nueva línea de investigación en el país que busca utilizar técnicas moleculares para mejorar nuestro conocimiento sobre especies invasoras. Probablemente, el uso de otros marcadores moleculares o técnicas de análisis como la electroforesis capilar o secuenciación, deberían ser exploradas en el futuro.

Agradecimientos

A Wilmar Bolívar, Ángela María González, Rodrigo Lozano, Natalia Rivera, Fernando Díaz y Mario F. Garcés por su aporte en diferentes etapas de la investigación. Al laboratorio de Biología Molecular y de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle. Este estudio fue cofinanciado por CVC y Univalle (convenio 054/2014).

REFERENCES

1. Fontanilla IKC. *Achatina (Lissachatina) fulica* BOWDICH: Its molecular phylogeny, genetic variation in global populations, and its possible role in the spread of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (CHEN), [Tesis doctoral]. Nottingham: Universidad de Nottingham; 2010.
2. Tomiyama K. Mate-choice criteria in a protandrous simultaneously hermaphroditic land snail *Achatina fulica* (Férussac)(Stylommatophora: Achatinidae). *J MollusStud* 1996; 62(1): 101-111.
3. De la Ossa-Lacayo A, De la Ossa J, Lasso C. Registro del caracol africano gigante *Achatina fulica* (Bowdich 1822) (Mollusca: Gastropoda-Achatinidae) en Sincelejo, Costa Caribe de Colombia. *Biota colombiana*. 2012; 13(2):247-252.
4. Fontanilla IKC, Maria IMPS, Garcia JRM, Ghate H, Naggs F, Wade CM. Restricted Genetic Variation in Populations of *Achatina (Lissachatina) fulica* outside of East Africa and the Indian Ocean Islands Points to the Indian Ocean Islands as the Earliest Known Common Source. *PloSone*. 2014; 9(9): 1-9. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0105151>
5. Martínez-Escarbassiere R, Martínez E, Castillo O. Distribución geográfica de *Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822) (Gastropoda-Stylommatophora- Achatinidae) en Venezuela. *Mem Fund La Salle de Cienc Nat*. 2008; 169:93-106.
6. Constantino-Santos DMA, Basiao ZU, Wade CM, Santos BS, Fontanilla IKC. Identification of *Angiostrongylus cantonensis* and other nematodes using the SSU rDNA in *Achatina fulica* populations of Metro Manila. *Trop Biomed* 2014; 31(2):327-335.
7. Vogler RE, Beltramino AA, Sede MM, Gregoric DEG, Núñez V, Rumi A. The Giant African Snail, *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae): using bioclimatic models to identify South American areas susceptible to invasion. *Amer Malac Bull* 2013; 31(1):39-50.
8. Sarma RR, Munsu M, Ananthram AN. Effect of Climate Change on Invasion Risk of Giant African Snail (*Achatina fulica* Férussac, 1821: Achatinidae) in India. *Plo Sone* 2015; 10(11): 1-16. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0143724>.
9. Silva ECD, Omena EP. Population dynamics and reproductive biology of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) in Salvador-Bahia. *Biota Neotrop* 2014; 14(3):1-11.
10. Vázquez AA, Sánchez J. First record of the invasive land snail *Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822) (Gastropoda: Achatinidae), vector of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae), in Havana, Cuba. *Molluscan Res* 2015; 35(2):139-142.
11. Giraldo A, Bolívar W, González A. Caracol africano en el Valle del Cauca: línea base para el Valle del Cauca. Primera edición. Colombia: Universidad del Valle; 2014.
12. Resolución Número 654 de Abril 7 2011. Por el cual se corrige la Resolución No. 0848 del 23 de mayo de 2008 y se adoptan las medidas que deben seguir las autoridades ambientales, para la prevención, control y manejo de la especie Caracol Gigante Africano (*Achatina fulica*). *Diario Oficial*, n 48.041; 2011.
13. Arnaud JF, Laval G. Stability of genetic structure and effective population size inferred from temporal changes of microsatellite DNA polymorphisms in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Biol J Linn Soc Lond* 2004; 82(1):89-102.
14. Stapley J, Santure WA, Dennis SR. Transposable elements as agents of rapid adaptation may explain the genetic paradox of invasive species. *Mol Ecol* 2015; 24(9):2241-2252.
15. Bock DG, Caseys C, Cousens RD, Hahn MA, Heredia S.M, Hubner S, et al. What we still dont know about invasion genetics. *Mol Ecol* 2015; 24 (9):2277-2297.
16. Morrison CL, Springmann MJ, Iwanowicz D.D, Wade M. Development of ten microsatellite loci in the invasive giant African land snail, *Achatina (=Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822. *Conserv Genet Resour* 2014; 7(1):201-202.

17. Alberico M, Saavedra R, García-Paredes H. Criterios para el diseño e instalación de casas para murciélagos: Proyecto CPM (Cali, Valle del Cauca, Colombia). *Actual Biol* 2004; 26 (80): 5-11.
18. Guillot G, Santos F, Estoup A. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 2008; 24(11): 1406-1407.
19. Peakall R, Smouse PE. GenAEx6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 2006; 6:288-295.
20. Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. *Ecología molecular*. Primera edición. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2007.
21. Miranda MS, Fontenelle JH, Pecora IL. Population structure of a native and an alien species of snail in an urban area of the Atlantic Rainforest. *J Nat Hist* 2015; 49(1):19-35.
22. Vallejo ELB, Cabo VG, Moreno E. La competitividad como elemento esencial para el desarrollo de las regiones. Una mirada al Valle del Cauca. *Gestión y Desarrollo* 2015; 8(1):51-78.
23. Castell OC, Niño EDS, Castellanos RSU, Lugo CY. *Infraestructura portuaria en Colombia: Asimetrías entre el puerto de Buenaventura y el puerto de Cartagena para el año 2015*. Universidad & Empresa 2016; 19(32): 87-106.
24. Caballero-Aldana DV. Distribución del Caracol Gigante Africano (*Achatina fulica*) en el Área Metropolitana de Bucaramanga en el año 2011. *Rev Univ Ind Santander Salud* 2012; 44(3):66-66.