

**VARIACION MORFOLOGICA, VARIACION GENETICA Y ESTRUCTURA
POBLACIONAL EN POBLACIONES ALOPATRICAS DE *Bufo spinulosus*
(ANURA:BUFONIDAE) EN CHILE.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas con mención en Zoología.

Facultad de Ciencias

por

Eduardo Román Soto Marambio

Marzo, 2003.

Director de Tesis: Dr. Alberto Veloso Martínez.

A mis padres

A mi hermano

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta larga etapa (incluso a momentos “interminable”), quiero expresar mis sinceros agradecimientos a todos aquellos que de alguna u otra forma permitieron llevar a término esta tesis.

A mí apreciado tutor, Dr. Alberto Veloso, por su comprensión, apoyo incondicional y paciencia durante todo el desarrollo de mi tesis.

A los miembros de la comisión examinadora, Dr. Michel Salaberry y Dr. Eduardo Palma por los importantes aportes y sugerencias hechas a mi tesis.

A Marco Méndez, por su amistad y apoyo invaluable, sin lo cual no hubiese sido posible llevar a cabo esta empresa.

Por sus constantes sugerencias, por su gran disposición y tiempo agradezco a la Dra. Patricia Iturra y al Dr. Lafayette Eaton.

Por su gran amistad, colaboración en el trabajo de terreno y de laboratorio a: Gonzalo Benavides, Claudio Correa, Soledad Cortez, Paula Imbert, Marco Méndez, Carlos Pino, Luis Rodríguez, Michel Salaberry, Sergio Scott, Mauricio Soto, Eliseo Vergara y Nora Vergara, y a todos aquellos que aportaron con su granito de arena, no sólo en mis estudios, sino también en mi desarrollo como persona.

Finalmente quiero agradecer a Dios, a mis padres, a mi hermano y a mi familia por su apoyo y cariño, y a Soledad y Leandro por el amor y paciencia entregados, especialmente en los momentos difíciles.

Esta tesis fue financiada parcialmente por Proyecto FONDECYT 3000048-2000; Apoyo del Programa Interdisciplinario de estudios en Biodiversidad, Departamento de Investigación y Desarrollo (DID).

INDICE DE MATERIAS

	PÁGINA
PÁGINAS PRELIMINARES	
Página de título	i
Informe de aprobación	
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice de materias	iv
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS DE TRABAJO	5
OBJETIVOS GENERALES	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6

INDICE DE MATERIAS

(Continuación)

MATERIALES Y METODOS	7
• Morfometría	7
• Obtención de muestras para análisis genético (RAPD-PCR)	14
• Extracción de DNA y amplificación.	15
• Mezcla de reacción para PCR.	16
• Análisis de los productos de RAPD-PCR.	18
• Estructura de poblaciones.	18
a) Porcentaje de loci polimórficos	19
b) Subdivisión poblacional	19
c) Flujo genético	20
d) Cálculo de distancias genéticas	21
• Comparación de variación genética y morfométrica.	22
 RESULTADOS	 24
• Análisis Morfométrico	24
• Análisis genético poblacional.	31
• Análisis molecular (RAPD-PCR)	45
• Análisis Morfométrico.	35
• Correlación entre factores Genéticos y Morfométricos.	51

INDICE DE MATERIAS**(Continuación)**

DISCUSION	57
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXO I	75
ANEXO II	78

LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1: Ejemplares y descripción de localidades utilizados para análisis genético y morfométrico en <i>Bufo spinulosus</i> .	10
Tabla 2: Caracteres de la morfología externa utilizados en el análisis de <i>B. spinulosus</i> .	12
Tabla 3: Partidores (primers) probados en análisis genético de <i>B. spinulosus</i> .	17
Tabla 4: Partidores y características de los mismos, utilizados en análisis de RAPD-PCR en <i>B. spinulosus</i> .	17
Tabla 5: Resumen de resultados de Análisis de Covarianza (ANCOVA) en caracteres morfométricos.	26
Tabla 6: Resumen de los resultados de valores propios de análisis de Componentes Principales (PCA).	28
Tabla 7: Resumen de resultados de Análisis Discriminante (DA).	30
Tabla 8: Análisis genético poblacional: Valores de Polimorfismo en poblaciones de <i>Bufo spinulosus</i> , utilizando 84 loci.	36
Tabla 9: Análisis genético poblacional: Valores de Polimorfismo en poblaciones de <i>Bufo spinulosus</i> utilizando 64 loci.	37

LISTA DE TABLAS**(Continuación)**

Tabla 10: Valores de Ht, Hs, Gst y flujo genético obtenidos a partir del análisis poblacional utilizando marcadores RAPDs.	39
Tabla 11: Comparación entre poblaciones de los valores de Gst y Flujo genético (Nm) utilizando 84 y 64 loci.	40
Tabla 12: Valores de identidad y distancia genética de Nei corregidas utilizando 84 loci.	41
Tabla 13: Valores de identidad y distancia genética de Nei corregidas utilizando 64 loci.	42
Tabla 14: Valores de distancia y distancias Euclidianas genéticas, morfométricas, geográficas y ambientales.	53
Tabla 15: Resumen de los resultados de test no paramétrico (Test de Mantel) entre distancias genéticas, morfométricas, geográficas, temperatura y altitud de las distintas localidades estudiadas.	56

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Mapa de localidades del Norte y Centro de Chile estudiadas en <i>Bufo spinulosus</i> .	9
Figura 2: Fotografía de hembras adultas de <i>Bufo spinulosus</i> provenientes de tres localidades de Chile.	11
Figura 3: Esquema de los caracteres de morfología externa utilizados en análisis morfométrico	13
Figura 4: Gráfico de tamaño corporal en función de la localidad de procedencia en <i>B. spinulosus</i> .	27
Figura 5: Gráfico de variación morfológica obtenido a partir de los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (PCA).	29
Figura 6: Perfiles de los productos RAPDs obtenidos en individuos de <i>B. spinulosus</i> .	33
Figura 7: Arbol UPGMA entre poblaciones <i>B. spinulosus</i> obtenido con distancia de Nei (1978) utilizando 84 loci.	43
Figura 8: Arbol UPGMA entre poblaciones de <i>B. spinulosus</i> obtenido con distancia de Nei (1978) utilizando 64 loci.	44
Figura 9: Arbol UPGMA en individuos de <i>B. spinulosus</i> obtenido mediante RAPD utilizando 84 loci.	47

LISTA DE FIGURAS**(Continuación)**

Figura 10: Arbol UPGMA en individuos de <i>B. spinulosus</i> obtenido mediante RAPD utilizando 64 loci.	48
Figura 11: Análisis de Coordenadas Principales (PCo) en poblaciones de <i>B. spinulosus</i> utilizando 84 loci.	49
Figura 12: Análisis de Coordenadas Principales (PCo) en poblaciones de <i>B. spinulosus</i> utilizando 64 loci.	50
Figura 13: Análisis de Cluster utilizando distancias Euclidianas en caracteres morfométricos y genéticos.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ANCOVA	: Análisis de Covarianza.
ANOVA	: Análisis de Varianza.
DA	: Análisis Discriminante.
DNA	: Acido Desoxirribonucleico
Nm	: Número de migrantes (flujo génico).
PCA	: Análisis de Componentes Principales.
PCo	: Análisis de Coordenadas Principales.
PCR	: Polimerase Chain Reaction.
RAPD	: Randomly Amplified Polimorphic DNA.
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method whit Arithmetic mean.

RESUMEN

Bufo spinulosus es un anfibio que se distribuye ampliamente en los Andes Peruano-Boliviano y Argentino, mientras que en Chile se pueden encontrar poblaciones distribuidas en el Norte Grande y Centro del país, presentando aislamiento entre ambas regiones mediado por las condiciones desérticas imperantes entre los 26° y 30° de latitud sur.

Estudios previos en caracteres de la morfología externa señalan la existencia de variación en función de la procedencia geográfica. Sin embargo, la falta de estudios a nivel genético poblacional no permiten establecer un modelo de estructura poblacional que ayude a explicar los patrones de diferenciación existente entre poblaciones de esta especie.

En este trabajo se estudia la variación morfométrica utilizando 17 caracteres de la morfología externa, y la variación genética mediante marcadores moleculares RAPD en individuos de *B. spinulosus* provenientes de siete poblaciones; cuatro poblaciones de la II región y tres poblaciones correspondientes a Chile Central. Los análisis morfométricos muestran un claro patrón de diferenciación Norte-Centro, encontrándose una tendencia positiva al aumento del tamaño corporal en función de la latitud, siendo la población de El Tatio la que presenta la mayor identidad como grupo, diferenciándose del resto de las poblaciones. A nivel genético se observó un patrón similar (Norte-Centro), donde las poblaciones muestran altos niveles de diferenciación genética entre sí. Una prueba de Mantel entre matrices de distancia genética, morfológica, geográfica y variables ambientales (temperatura y altitud), muestran una gran correlación de la

variable genética con la distancia geográfica, permitiendo establecer un modelo de aislamiento por distancia entre las poblaciones de *B. spinulosus* en Chile. La morfología, por su parte, aunque presenta una correlación significativa con todas estas variables, muestra bajos valores de r para explicar su variación con respecto a la distancia genética y geográfica. Estas diferencias se ajustan de mejor forma al no considerar en el análisis a la población de El Tatio, lo que sugiere que estos resultados estarían influenciados por variables ambientales, como es el caso de la temperatura del agua (aguas termales) presentes en esta localidad.

ABSTRACT

Bufo spinulosus is an amphibian that is distributed thoroughly in Peruvian-Bolivian and Argentinean Andes, while in Chile populations can be distributed in the Big North and Center of the country, presenting isolation among both regions mediated by the desertic conditions prevailing among the 26° and 30° of south latitude.

Previous studies in characters of the external morphology point out the variation existence in function of the geographical origin. However, the lack of studies at populational genetic level doesn't allow a model of populational structure that helps to explain the patterns of differentiation existing among populations of this species.

In this work the morphometric variation is studied using 17 characters of the external morphology, and the genetic variation by means of molecular markers RAPD in individuals of *B. spinulosus* coming from seven populations; four populations of the II region and three populations corresponding to Central Chile. The morphometric analysis shows a clear pattern of north-center differentiation, being a positive tendency to the increase of the corporal size in function of the latitude, where El Tatio population presents the biggest identity like group, differing of the rest of the populations. At genetic level a similar pattern was observed (north-center), where the populations show high levels of genetic diferenciación. A Mantel test among genetics, morphologic, geographical distance and environmental variables matrix (temperature and altitude), show a great correlation of the genetic variable with the geographical distance, allowing to establish an isolation distance model among the populations of *B. spinulosus* in Chile. The morphology, on the other hand, although it presents a significant correlation with all

these variables, it shows low values of r to explain their variation with regard to the genetic and geographical distance. These differences adjust from a better way when not considering in the analysis to the population of El Tatio, what suggests that these results would be influenced by environmental variables, like it is the case of the temperature of the water (thermal water) present in this locality.

INTRODUCCIÓN

Uno de los atributos universales observados en las poblaciones naturales es la diversidad fenotípica respecto a gran parte de sus caracteres (Hartl & Clark, 1997). Estas diferencias en el fenotipo observadas en las distintas poblaciones son atribuibles a un proceso continuo de selección, en la cual diversos caracteres pueden ser, en su conjunto, adaptativos (Mayr, 1963). Pese a que las poblaciones naturales de casi todas las especies generalmente se presentan subdivididas, a escalas geográficas más amplias, estas pueden mostrar un mayor grado de diferenciación genética debido a factores asociados, principalmente la presencia de barreras geográficas, disponibilidad de recursos y/o el aislamiento por distancia, entre otros.

Bufo spinulosus Wiegmann (1835) es un anfibio que presenta una amplia distribución geográfica, extendiéndose por todo el cinturón cordillerano andino a partir del altiplano Peruano-Boliviano, y en los Andes Argentinos desde los 1200 msnm. En Chile, esta especie se distribuye desde la I región de Tarapacá hasta la cordillera frente a Santiago sobre los 1200 msnm, en la zona altoandina de la cordillera de los Andes (Cei, 1962; Veloso y Navarro, 1985; Veloso *et al.*, 1982). Sin embargo, en la zona de Arica se pueden encontrar poblaciones desde el nivel del mar hasta los 4600 msnm. Esta especie presenta en Chile poblaciones en las quebradas y altiplano del norte grande, entre los 18° y 25° latitud sur aproximadamente. En la zona desértica comprendida entre los 26° y 30° de latitud sur (III y IV regiones), no existen registros de poblaciones, reapareciendo nuevamente en poblaciones de Chile central, en la cordillera frente a Santiago.

El estudio en otros taxa, permiten sugerir un patrón de aislamiento entre poblaciones de *Bufo spinulosus* del norte y centro del país. Kalin-Arroyo *et al* (1982) describen una ruptura en la distribución vegetacional de esta zona cerca de los 23° de latitud sur, señalando además que las condiciones imperantes entre las latitudes 30° y 38° de latitud sur constituyen barreras geográficas importantes en la distribución de la flora andina en el sector central de Chile.

Estudios realizados en *B. spinulosus* han mostrado variación en caracteres morfológicos (Cei, 1960; Veloso *et al*, 1982) y ecológicos (Nuñez *et al*, 1982; Jaksic, 1997) en función de su procedencia geográfica. En la morfología se han encontrado diferencias en el tamaño corporal y en índices biométricos entre poblaciones a lo largo de un gradiente altitudinal en la zona de Arica, mostrando una variación fenotípica interpoblacional bastante considerable (Veloso *et al*, 1982). La observación de individuos provenientes de diversas localidades del Norte y Centro de Chile permiten visualizar la gran variación morfológica existente entre estos individuos, encontrándose que individuos adultos del norte del país poseen un tamaño corporal menor en comparación con especímenes de las poblaciones de Chile central. Un caso particular corresponde a individuos provenientes de la población de El Tatio (II región), donde estas diferencias son aún más evidentes, presentando tamaños corporales considerablemente menores que individuos presentes en otras poblaciones de la región (ver Figura 2). Además de estas diferencias, Nuñez *et al* (1982) observaron una gran diferenciación en la longitud del tracto digestivo y en la dieta al analizar el contenido estomacal en *B. spinulosus* de San Pedro de Atacama y el Tatio, ambas localidades de la segunda región de Chile ubicadas a menos de 60 kms de distancia.

Desde el punto de vista genético, las investigaciones en *Bufo spinulosus* han estado restringidas a estudios cariológicos y de compatibilidad genética entre especies del grupo *spinulosus* (Mezey, 1979; Soto *et al.*, 1997) y filogenéticos (Mendez, 2000). Existen sólo algunos estudios preliminares y parciales, esto último en el sentido de que cuentan con pocas poblaciones e individuos analizados, utilizando marcadores moleculares que permiten comparar solo algunas de las poblaciones en que se encuentra, dando cuenta de la variabilidad genética existente (Soto *et al.*, 1999).

Considerando la amplitud en la distribución geográfica, *B. spinulosus* constituye un modelo adecuado en el cual se pueden verificar algunas hipótesis relacionadas a la variación geográfica de caracteres, especialmente de tipo cuantitativos sobre los cuales puede actuar la selección natural. Por otra parte, un análisis de la variabilidad genética en *B. spinulosus*, permitiría establecer el modelo de estructura genético poblacional que mejor explica la arquitectura espacio-temporal de esta especie. La importancia de esto radica en que la determinación del modelo que mejor se ajuste a la variabilidad encontrada, por lo general, constituye una de las primeras etapas en el conocimiento de la biología poblacional de cualquier especie (Hillis *et al.*, 1996), especialmente si se considera que las poblaciones naturales de casi todas las especies presentan algún grado de subdivisión, permitiendo que éstas evolucionen en forma separada y se diversifiquen. De esta forma, los modelos que explican la estructuración poblacional se fundamentan en la desviación de las mismas respecto a la ley de Hardy-Weinberg o panmixia, en las cuales se asumen tamaños poblacionales infinitos en poblaciones cerradas y en las cuales no existe migración de individuos entre las poblaciones. Puesto que los individuos de poblaciones naturales por lo general tienden a moverse desde una

población a otra, se han establecido los modelos de Isla de Wright con migración de individuos entre poblaciones (islas) los cuales tienen la misma probabilidad de moverse entre ellas, el modelo paso a paso (stepping stone o discontinuo), similar al modelo de islas pero en una dimensión, donde los individuos se moverían entre poblaciones vecinas en forma lineal, o el modelo de aislamiento por distancia (continuo) en el cual los individuos se distribuyen en forma continua, existiendo una mayor probabilidad de migrar entre las poblaciones más cercanas respecto a las que se encuentran más distantes. Estos modelos determinan los distintos patrones de diferenciación genética dentro, así como también entre las poblaciones, pudiendo aportar claves importantes sobre la estructura espacio-temporal de la especie estudiada.

HIPOTESIS DE TRABAJO

- La variación genética y fenotípica observada en las poblaciones de *Bufo spinulosus* en Chile se ajustan al modelo de estructura genético-poblacional de aislamiento por distancia, el que predice una correlación positiva entre la variabilidad fenotípica y genotípica con la distancia geográfica entre poblaciones.

OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Realizar un estudio comparativo en *Bufo spinulosus* orientado a establecer la variabilidad fenotípica y genética intra e interpoblacional existente a lo largo de su distribución geográfica en Chile.
2. Determinar el modelo de estructura genético-poblacional de *B. spinulosus* utilizando marcadores moleculares.

Objetivos Especificos

- a) Determinar la variación entre poblaciones de *Bufo spinulosus* de la II Región y centro de Chile mediante análisis morfométrico.
- b) Determinar la variabilidad genética intra e interpoblacional de *B. spinulosus* utilizando marcadores moleculares (RAPD-PCR).
- c) Establecer los niveles de flujo genético existentes entre las distintas poblaciones estudiadas en *B. spinulosus*.
- d) Comparar los niveles de variabilidad morfológica y genética entre las poblaciones estudiadas, analizando los posibles factores ambientales que dan cuenta de los patrones de variación entre la distintas poblaciones de *B. spinulosus* estudiadas.

MATERIALES Y METODOS

Morfometría.

Se analizó un total de 118 individuos adultos de *Bufo spinulosus* provenientes de 7 localidades de Chile: El Tatio (N=18), Cuesta de Chita (N=13), Vilama (N=21) y Quebrada de Jerez (N=14), todas localidades de la II Región de Antofagasta; Portillo (N=8), Farellones (N=33) y Lagunillas (N=11) correspondientes a poblaciones de Chile Central (Figura 1 y Tabla 1). El material utilizado fue depositado en la Colección Herpetológica del Departamento de Biología y Genética de la Universidad de Chile (DBGUCH), analizando además especímenes correspondientes a la misma colección.

Para el análisis biométrico se realizaron mediciones en 17 caracteres de la morfología externa (Tabla 2 y Figura 3). Las mediciones fueron realizadas con un vernier Mitutoyo (0.05 mm) por la misma persona, estandarizando posteriormente cada medición por el largo antero-posterior (LAP) de cada individuo. Los valores fueron normalizados transformándolos a \log_{10} . Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) sobre el tamaño corporal de los individuos (LAP), utilizando como factor la localidad de procedencia, realizando un análisis de covarianza (ANCOVA) con el resto de los caracteres estudiados en las distintas poblaciones tomando como cofactor la localidad de procedencia (Tabla 4). Posteriormente se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el programa SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1996), graficando los componentes que explicaron al menos un 70% de la varianza total. Con los valores canónicos de los caracteres utilizados para el análisis PCA, se realizó un Análisis de Función Discriminante (DFA; SYSTAT 9.0) utilizando la localidad como factor de

clasificación. Se utilizó el método Jackknife (Sokal & Rohlf, 1995) para estimar la razón de individuos mal clasificados de la función discriminante.

FIGURA 1

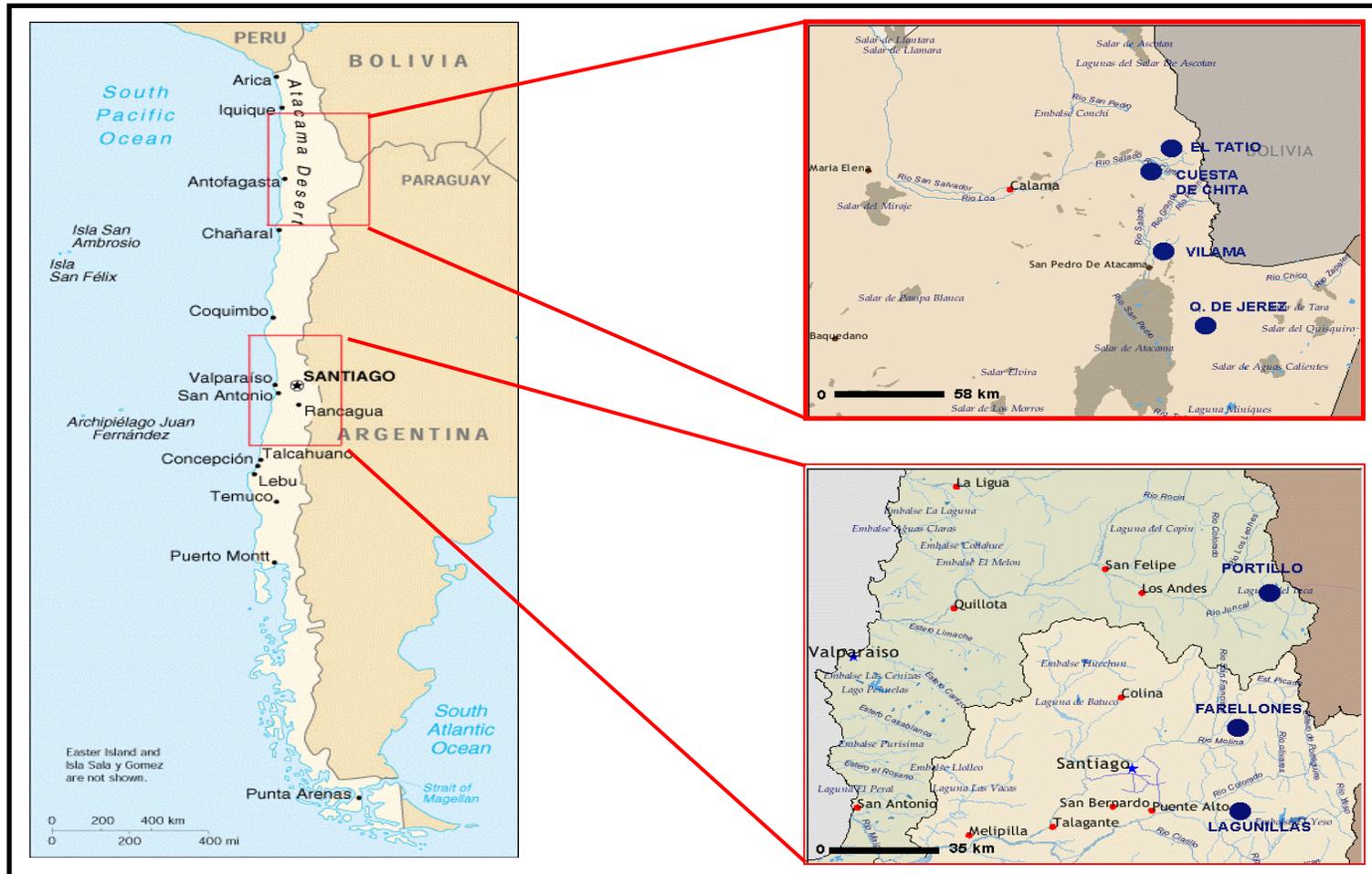


Figura 1: Localidades muestreadas en el Norte Grande (II Región, Antofagasta) y Centro (V Región y R. Metropolitana) en Chile. Con puntos azules se muestran las poblaciones de *Bufo spinulosus* correspondientes a estas dos regiones.

TABLA 1

POBLACION	COORDENADAS	ALTURA (msnm)	N= individuos utilizados	
			Morfología	Genética
TATIO	22°20'S; 68°01'W	4264	18	10
CUESTA DE CHITA	22°25'S; 68°10'W	3741	13	10
VILAMA	22°52'S; 68°10'W	2579	21	10
QUEBRADA DE JEREZ	23°11'S; 67°59'W	2513	14	10
PORTILLO	32°51'S; 70°10'W	2119	8	10
FARELLONES	33°21'S; 70°18'W	2331	33	10
LAGUNILLAS	33°36'S; 70°17'W	2242	11	4

Tabla 1: Localidades de *Bufo spinulosus* estudiadas. Se detallan sus respectivas coordenadas geográficas y alturas. Se muestra el número de individuos analizados mediante morfometría y genética.

FIGURA 2

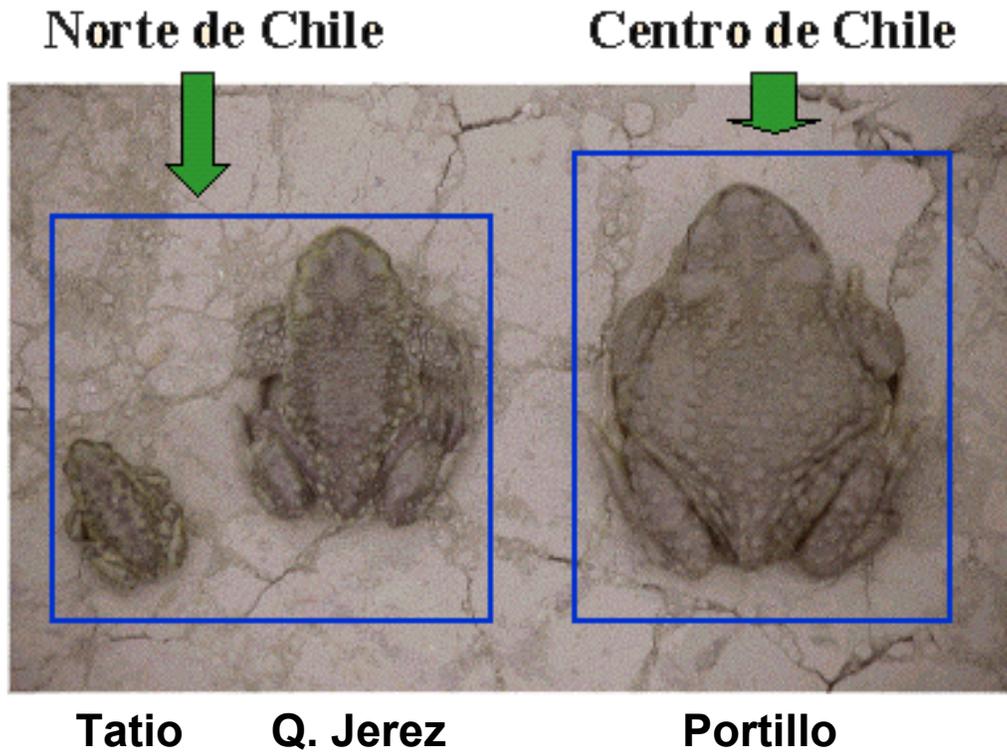


Figura 2: Hembras de *Bufo spinulosus* procedentes de tres localidades de Chile utilizados en este estudio. Las poblaciones de El Tatio y Quebrada de Jerez corresponden a la II región, y Portillo a la zona de Chile central. En la fotografía es posible apreciar la diferencia en tamaño entre los individuos de las distintas poblaciones.

TABLA 2

1) Largo antero-posterior (LAP): desde hocico hasta la cloaca.
2) Ancho de la cabeza (ANC): medido a la altura de los tímpanos.
3) Altura de la cabeza (ALC): medida a la altura del eje interorbital.
4) Ancho de la mandibula inferior (AMANB): tomada en el extremo más ancho de la mandíbula.
5) Largo de la pata anterior (LPA): desde el segundo dedo hasta la axila.
6) Largo de la pata posterior 1 (LPP1): separada en la distancia desde el segundo dedo a la articulación metatarsal.
7) Largo de la pata posterior 2 (LPP2): desde la articulación metatarsal a la rodilla.
8) Largo de la pata posterior 3 (LPP3): desde la rodilla a la cloaca.
9) Distancia narina-boca (DNARB): desde la punta del hocico al eje de la narina.
10) Distancia narina-ojo (DNAROJ): distancia desde uno de los orificios de la narina hasta el bode más inferior del ojo.
11) Ancho interorbital (ANINTER): ancho del eje entre los bordes interiores de los ojos.
12) Largo hocico-eje interorbital (LPUNT): largo desde la punta del hocico hasta el eje interorbital.
13) Diámetro de la parótida (DPAR): diámetro en sentido antero-posterior.
14) Distancia entre narinas (AINTENA): ancho entre los orificios de las narinas.
15) Diámetro del ojo (DOJO): diámetro del párpado del ojo.
16) Diámetro del tímpano (DTIM): medido en sentido antero-posterior.
17) Largo de la cabeza (LC): medido desde la punta del hocico al eje entre los tímpanos.

Tabla 2: Caracteres morfométricos analizados en *B. spinulosus*. En la Figura 2 se muestran en forma esquematizada estas mediciones (Mendez, 2000).

FIGURA 3

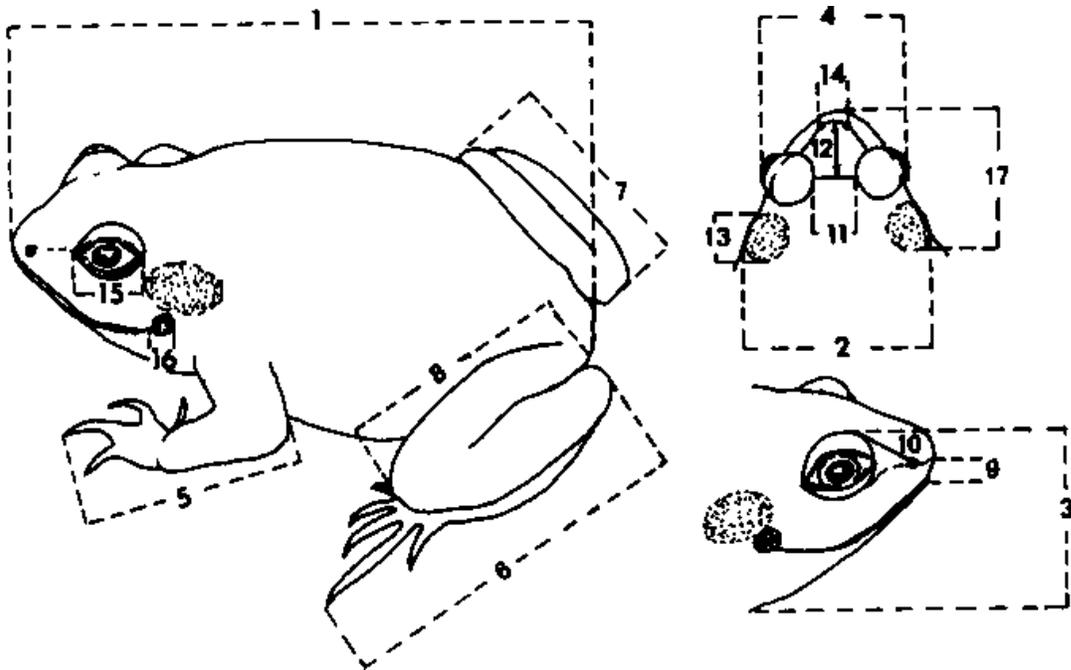


Figura 3: Mediciones de la morfología externa realizadas en *Bufo spinulosus* (Mendez, 2000). Los detalles de las mismas se muestran en la Tabla 2.

Obtención de muestras para análisis genético (RAPD-PCR).

Se analizaron un total de 64 especímenes adultos y juveniles de *Bufo spinulosus* de las 7 localidades señaladas anteriormente: El Tatio (N=10), Cuesta de Chita (N=10), Vilama (N=10), Quebrada de Jerez (N=10), Portillo (N=10), Farellones (N = 10) y Lagunillas (N=4). Los individuos y localidades estudiadas se detallan en la Tabla 1 y Figura 1.

Los animales fueron mantenidos en terrarios y alimentados periódicamente con larvas de *Tenebrio molitor* hasta el momento de ser procesados. Al momento de extraer las muestras, los animales anestesiados fueron sacrificados por punción cervical, extrayéndose una porción de hígado y la primera falange del dedo pulgar de la pata anterior derecha, siendo guardados estos tejidos en tubos eppendorf aproximadamente en tres volúmenes de Etanol absoluto (Sigma, 99 % P.A), y mantenidos a -4° C hasta el momento de la extracción de DNA.

Los individuos fueron etiquetados y depositados en la colección herpetológica del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Chile (DBGUCH).

Extracción de DNA y amplificación.

Para la extracción de DNA a partir de muestras de hígado o dedo se utilizó el método Fenol-Cloroformo, el que se detalla a continuación: se maceró un trozo de aproximadamente 3 mm de diámetro en una mezcla de 600 μL de buffer STE, 30 μL de SDS al 20% y 5.5 μL de proteinasa K dentro de un tubo eppendorf en frío. La mezcla se agitó durante toda la noche a 50 – 55 °C, hasta que el tejido se disolviera completamente. Posteriormente se agregaron 600 μL de fenol saturado sobre la muestra anterior, agitando el tubo hasta obtener una solución turbia y se centrifugó por 10 min a 2500 rpm. Posteriormente se traspasó el sobrenadante a otro tubo agregando 500 μL de Fenol:Cloroformo (1:1) y Cloroformo:Isoamílico (24:1), siguiendo el mismo procedimiento antes descrito. Para la precipitación de ADN se agregaron 900 μL de etanol absoluto a -20°C , y una vez precipitado se tomó con una punta de vidrio, el cual se sumergió en etanol al 70% antes de dejarlo secar, resuspendiendo la muestra finalmente en buffer TE 0.1X. La muestra fue mantenida a 37°C durante toda la noche y agitada durante 24 hrs para disolver completamente el DNA. La concentración de ADN fue medida a 280 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente se realizaron diluciones de aproximadamente 10ng/ μL para llevar a cabo la reacción de PCR.

Mezcla de reacción para PCR

Para realizar la reacción de PCR se utilizó un volumen total de mezcla de 15 μL con las siguientes cantidades: 1.65 μL de H_2O destilada estéril; 1.5 μL buffer PCR (10X); 0.75 μL MgCl_2 (50 mM); 0.18 μL dNTPs (10 mM); 6.25 μL partidor (1.2 μM); 0.17 μL Taq DNA polimerasa (5U/ μL , Gibco Technologies); 4.5 μL ADN (10ng/ μL). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts) siguiendo el siguiente programa: 2 min a 95 °C; 6 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 35 °C y 2 min a 72 °C; 30 ciclos de 10 seg. a 94 °C, 30 seg. a 35 °C y 1 min a 72 °C, finalizando con 1 ciclo de 5 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron cargados en geles de agarosa al 1.5%, y corridos a 60V durante tres horas aproximadamente en buffer TBE 5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y fotografiados posteriormente en un transiluminador UV.

Para la amplificación mediante marcadores RAPDs (Randomly Amplified Polimorphic DNA) se probaron 20 partidores (primers) aleatorios de 10 pb (Operon Technologies Inc.), los cuales se encuentran descritos en la Tabla 3. Seis de estos 20 partidores presentaron polimorfismo en las poblaciones estudiadas, por lo que fueron seleccionados para posteriores amplificaciones y análisis genéticos. Las características de estos partidores se detallan en la Tabla 4.

TABLA 3

Código	Código
OPM-03	OPB-03
OPM-08	OPB-04
OPM-10	OPB-05
OPM-12	*OPB-08
OPM-16	*OPB-10
*OPG-05	*OPB-11
*OPG-06	OPB-13
*OPG-14	OPB-14
OPG-15	OPB-15
OPG-19	OPB-19

Tabla 3: Partidores utilizados con RAPD-PCR en *Bufo spinulosus*. Los partidores señalados con asterisco (*) fueron seleccionados para el análisis genético por presentar polimorfismo entre los individuos de las poblaciones estudiadas.

TABLA 4

Nombre Partidor	Secuencia	Nº de bandas analizadas
OPB-08	5'-GTCCACACGG-3'	17
OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'	15
OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'	11
OPG-05	5'-CTGAGACGGA-3'	15
OPG-06	5'-GTGCCTAACC-3'	14
OPG-14	5'-GGATGAGACC-3'	12

Tabla 4: Partidores utilizados en el análisis genético (RAPD-PCR). Se detalla la secuencia de los partidores y el número de loci analizados en cada gel (bandas).

Análisis de los Productos de RAPD-PCR.

Los patrones de bandeo obtenidos se analizaron considerando la presencia o ausencia de las bandas más conspicuas para cada uno de los partidores en los distintos individuos. Para evaluar la repetibilidad de los patrones de bandeo, se realizaron entre tres y cuatro amplificaciones mediante RAPD-PCR para cada una de las muestras, con cada uno de los partidores utilizados, seleccionando las bandas que presentaron al menos un 75 % de repetibilidad. El número de loci utilizado para el análisis para cada partidior se muestra en la Tabla 4.

Para la construcción de la matriz de caracteres obtenidos mediante RAPD se utilizó el grupo de programas RAPDistance Package 1.04 (Armstrong et al 1999). Posteriormente, basado en el estudio de Lynch y Milligan (1994, ecuación 2a), se realizaron correcciones a estas matrices, eliminando las bandas que presentaron en sus alelos nulos (ausentes) una frecuencia menor a $3/N$, donde N corresponde al tamaño de la muestra analizada, en este caso 64 individuos. Esta corrección es recomendada para evitar el sesgo en el análisis genético poblacional atribuido a la dominancia de los marcadores RAPD.

Estructura de poblaciones y agrupamiento (Cluster).

Para evaluar la diversidad genética intra e interpoblacional, además de otros parámetros genético poblacionales se utilizó el programa POPGENE 1.3.1 (Yeh and

Boyle, 1997). Los parámetros genéticos poblaciones utilizados en este estudio son los siguientes:

Porcentaje de loci polimórficos

Corresponde a la suma total de los loci que presentan polimorfismo (loci polimórficos observados), divididos por el número total de loci analizados. En el caso de marcadores RAPD, se considera que un loci es polimórfico cuando este presenta sus dos variantes alélicas (presencia o ausencia de banda) independientemente de su frecuencia.

Subdivisión Poblacional

Un parámetro utilizado comunmente para describir la estructuración genético poblacional en organismos diploides son los estadígrafos de F de Wright (Avice, 1994; Hart y Clark, 1997). Estos estadígrafos permiten cuantificar el efecto de consanguinidad en las poblaciones subestructuradas. Estos se definen como F_{SR} , F_{RT} y F_{ST} .

F_{SR} : Se define como la disminución de heterocigosidad entre subpoblaciones dentro de regiones respecto a la heterocigosidad entre regiones.

F_{RT} : Se define como la reducción en la heterocigosidad de la región respecto al total de las poblaciones.

F_{ST} : También conocido como índice de fijación, explica los cambios en la heterocigosidad debido a la subdivisión poblacional y deriva genética, y es el estimador de diferenciación existente entre las poblaciones. Dependiendo de su valor, Hart y Clark

(1997) establecen el siguiente criterio para clasificar el grado de diferenciación entre poblaciones:

Valores de F_{ST} (Tomado de Hartl & Clark, 1997)

0.00 - 0.05	Diferenciación genética pequeña
0.05 - 0.15	Diferenciación genética moderada
0.15 - 0.25	Diferenciación genética alta
$F_{ST} > 0.25$	Diferenciación genética muy alta

En el caso de marcadores RAPD utilizados en este estudio, el estimador utilizado para estimar diferenciación genética es el estadígrafo G_{ST} , análogo al F_{ST} de Wright, utilizado en el caso de análisis de datos haploides.

Flujo genético

El flujo genético se define como la transferencia de material genético entre poblaciones dado por el movimiento de individuos o de sus gametos, y se expresa como la tasa de migración m (Avice, 1994). Las estimaciones de flujo genético se basan en modelos teóricos de estructura espacial de las poblaciones, como son el modelo de isla, el modelo paso a paso (stepping stone) o el modelo de aislamiento por distancia (continuo). Sin embargo, la estimación de este parámetro se realiza en forma indirecta a partir de estos modelos a partir de estadísticos como F_{ST} o G_{ST} en el caso de los RAPD, o bien por el método de alelos privados.

En este estudio se utilizó el primer método para obtener Nm a partir de G_{ST} , el cual se puede definir como el número absoluto de individuos intercambiados entre poblaciones por generación, y que se calcula según la siguiente ecuación:

$$Nm = 0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST}$$

donde

N : tamaño de la población

m : tasa de migración

G_{ST} : índice de fijación.

Cálculo de distancias genéticas

Mediante el programa POPGENE se obtuvieron las medidas de identidad y distancia genética de Nei corregidas (Nei, 1978). Como resultado se obtuvo un dendrograma que permite apreciar las relaciones a nivel poblacional de los datos analizados considerando la totalidad de los datos y los datos corregidos según el criterio de Lynch y Milligan (1994).

El análisis de agrupamiento (Cluster) entre individuos de las poblaciones estudiadas fue realizado mediante el programa NTSYS-PC 1.8 (Rohlf, 1998), utilizando la distancia de Nei72 (Nei, 1972) como se muestra en la ecuación 1:

Ecuación 1

Distancia genética de Nei (1972)

$$d_{ij} = - \ln \frac{\sum_k |x_{ki} x_{kj}|}{\sqrt{\sum_k x_{ki}^2 x_{kj}^2}}$$

Los árboles fueron construidos utilizando el algoritmo UPGMA para los datos totales y corregidos mediante Lynch y Milligan (1994). La validez de los nodos de los árboles obtenidos fue estimada realizando un Bootstrap con 1000 replicas para cada uno de estos algoritmos utilizando el programa TreeFree versión 0.9.1.50 (Pavlièek *et al.*, 1999).

A partir de los valores de distancia genética de Nei (1972) se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (Principal Coordinates Analysis, PCo) utilizando el programa NTSys con los datos totales y corregidos según el criterio de Lynch y Milligan (1994).

Comparación de variación a nivel morfométrico y genético.

Los valores de las matrices de distancia morfológica, obtenida de los valores canónicos de Análisis Discriminante, y distancia genética de Nei obtenida mediante el programa POPGENE, fueron transformados a distancias Euclidianas utilizando el programa STATISTICA (1996). Con estos se construyeron árboles UPGMA utilizando como opción de agrupamiento ligamiento completo (complete linkage). Posteriormente se calcularon las distancias geográficas en kms, diferencias en la altitud y en temperatura del agua entre las distintas poblaciones estudiadas construyendo matrices que fueron transformadas a distancias Euclidianas con el mismo criterio anterior. Estas matrices fueron utilizadas para investigar los posibles agentes causales de los patrones observados a nivel morfométrico y genético de las distintas poblaciones mediante un test no

paramétrico (test de Mantel; Mantel, 1967) de asociación de matrices. Para realizar este análisis se utilizó el programa Mantel 2.0 (Liedloff, 1999), llevando a cabo 1000 aleatorizaciones. El análisis se realizó considerando todas las poblaciones en un primer paso, y posteriormente el mismo análisis se llevó a cabo excluyendo a la población del Tatio.

RESULTADOS

Análisis Morfométrico:

El gráfico de tamaño corporal (LAP) en función de la localidad de procedencia (Figura 4), permite visualizar la variación observada entre los individuos de las distintas poblaciones de *B. spinulosus* analizados, como se muestra en la Figura 2. En este se puede identificar un gradiente en sentido norte-sur, donde los individuos del norte presentan un tamaño menor que los de la zona central. Se realizó un análisis de varianza entre machos y hembras, no presentando diferencias significativas entre sexos (ANOVA: $F=112.4$; $g.l.=6.1$; $p < 0.99$), por lo cual se realizaron los análisis posteriores considerando todos los individuos adultos independientemente del sexo. El tamaño corporal mostró diferencias significativas entre las localidades estudiadas (ANOVA: $F=128.738$; $g.l.=6.114$; $p < 0.0001$), encontrándose que las poblaciones del norte de Chile muestran un menor tamaño en comparación a las poblaciones de Chile central, mientras que los individuos de la población de El Tatio son mucho más pequeños que el resto de las poblaciones estudiadas (Test de Tukey: $p < 0.05$). En el resto de los caracteres el análisis de covarianza (ANCOVA), considerando el tamaño corporal (LAP) como cofactor, muestra diferencias significativas entre las localidades (Tabla 5), exceptuando tres caracteres: largo de la pata anterior (LPA), distancia narina-boca (DNARB) y largo hocico-eje interorbital (LPUNT; ver Figura 3 y Tabla 2).

El análisis de Componentes Principales considerando los 16 caracteres estandarizados por tamaño corporal (LAP) muestra que los tres primeros factores

explican la mayor parte de la varianza total (83.13 %), con valores de 71.903%, 6.349% y 4.883% respectivamente para cada uno de los factores (Tabla 6). Considerando que los valores de carga en el primer PC para cada uno de los 16 caracteres analizados tienen igual signo y magnitudes similares, se mantuvieron todos los caracteres para los análisis posteriores. Se construyó un gráfico utilizando los dos primeros componentes, PC1 y PC2, los que explican un 78,3 % de la varianza total, mostrando diferenciación en tres grupos: un agrupamiento formado por los individuos de las poblaciones de Portillo, Farellones y Lagunillas (Centro), un segundo grupo que incluye a las poblaciones de Quebrada de Jerez, Vilama y Cuesta de Chita dentro de la II región, y un tercer grupo que corresponde a los individuos de la población de El Tatio, el cual se presenta claramente diferenciado del resto de las poblaciones de la II región (Figura 5). Pese a existir esta separación entre las poblaciones del Centro y Norte del país, existe sobreposición de los individuos pertenecientes a estos dos primeros grupos a diferencia de lo que ocurre con la población de El Tatio, quien presenta una gran identidad como grupo.

En el Análisis Discriminante (DA) realizado con los valores propios obtenidos en el PCA, utilizando como factor de agrupamiento la localidad de procedencia muestra diferencias significativas entre las localidades (Wilk's lambda=0.007; F=25.6; g.l.=18; $p < 0.0001$), encontrándose que un 55.1 % de los individuos quedan correctamente clasificados en cada una de las poblaciones después de aplicar Jackknife (Tabla 7). Dentro de las localidades los individuos de la población de El Tatio son los que presentan el nivel más alto de identidad, con la totalidad de los individuos correctamente asignados (100 %), seguido de Lagunillas con un 81.8 % y Farellones con un 60.6 %,

mientras que los individuos de Vilama y Q. De Jerez son los que presentan los niveles de identidad más bajos (23.8 % y 14.2 % respectivamente).

TABLA 5

Caracter	F	p
ANC	2.343	0.036
ALC	2.449	0.029
AMAND	7.708	0.000
LPA	2.104	N.S.
LPP1	7.562	0.000
LPP2	4.843	0.000
LLP3	3.555	0.003
DNARB	1.832	N.S.
DNAROJ	6.123	0.000
ANINTER	3.183	0.006
LPUNT	0.592	N.S.
DPAR	7.327	0.000
AINTERNA	2.477	0.027
DOJO	2.527	0.025
DTIM	8.576	0.000
LC	9.113	0.000

Tabla 5: Resumen del ANCOVA realizado en 16 caracteres de la morfología externa en individuos de las siete localidades estudiadas en *Bufo spinulosus*. Se muestran los valores de F y nivel de significancia para cada uno de los caracteres, realizando todas las comparaciones en individuos adultos utilizando el tamaño corporal (LAP) como cofactor. Las abreviaciones para los caracteres se muestran en la Tabla 4. N.S. : no significativo.

FIGURA 4

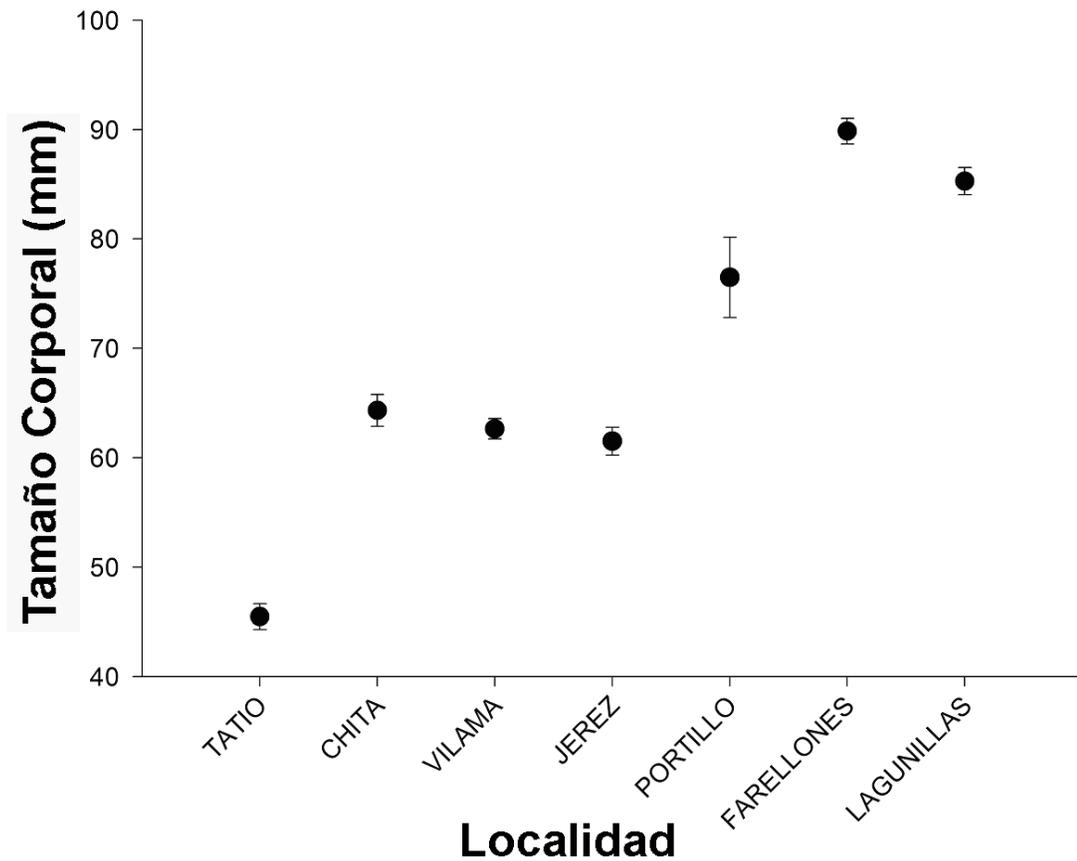


Figura 4: Gráfico del tamaño corporal (LAP) en función de la procedencia geográfica. El tamaño corporal se presenta en milímetros (mm). Las localidades están ordenadas de norte a sur.

TABLA 6

	Primer Eje	Segundo Eje	Tercer Eje
ANCCAB	0.223	0.027	0.007
ALTCAB	0.199	0.018	0.004
AMAND	0.236	0.005	-0.003
LPANT	0.234	0.020	0.006
LPP1	0.233	-0.014	-0.029
LPP2	0.227	0.012	0.006
LPP3	0.230	0.011	0.005
DNARBOCA	0.237	0.045	-0.042
DNAOJO	0.151	0.048	0.064
ANCINTORB	0.155	0.025	0.126
LPUNT	0.226	0.011	-0.121
DIAPAROT	0.213	-0.001	-0.041
AINTERNAS	0.118	0.124	0.080
DIAMOJO	0.144	0.034	-0.010
DIAMTIMPA	0.320	-0.206	0.061
LCABEZA	0.235	0.020	-0.040
Var. Exp. x comp.	0.750	0.066	0.051
TOTAL %	71.903	6.349	4.883

Tabla 6: Resumen para los tres primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (PCA) en *Bufo spinulosus*, con los respectivos valores de carga de los componentes (component loadings). Se presentan los porcentajes que explican la varianza de los caracteres para cada uno de los ejes.

FIGURA 5

VARIACION MORFOLOGICA ENTRE
POBLACIONES DE *Bufo spinulosus*

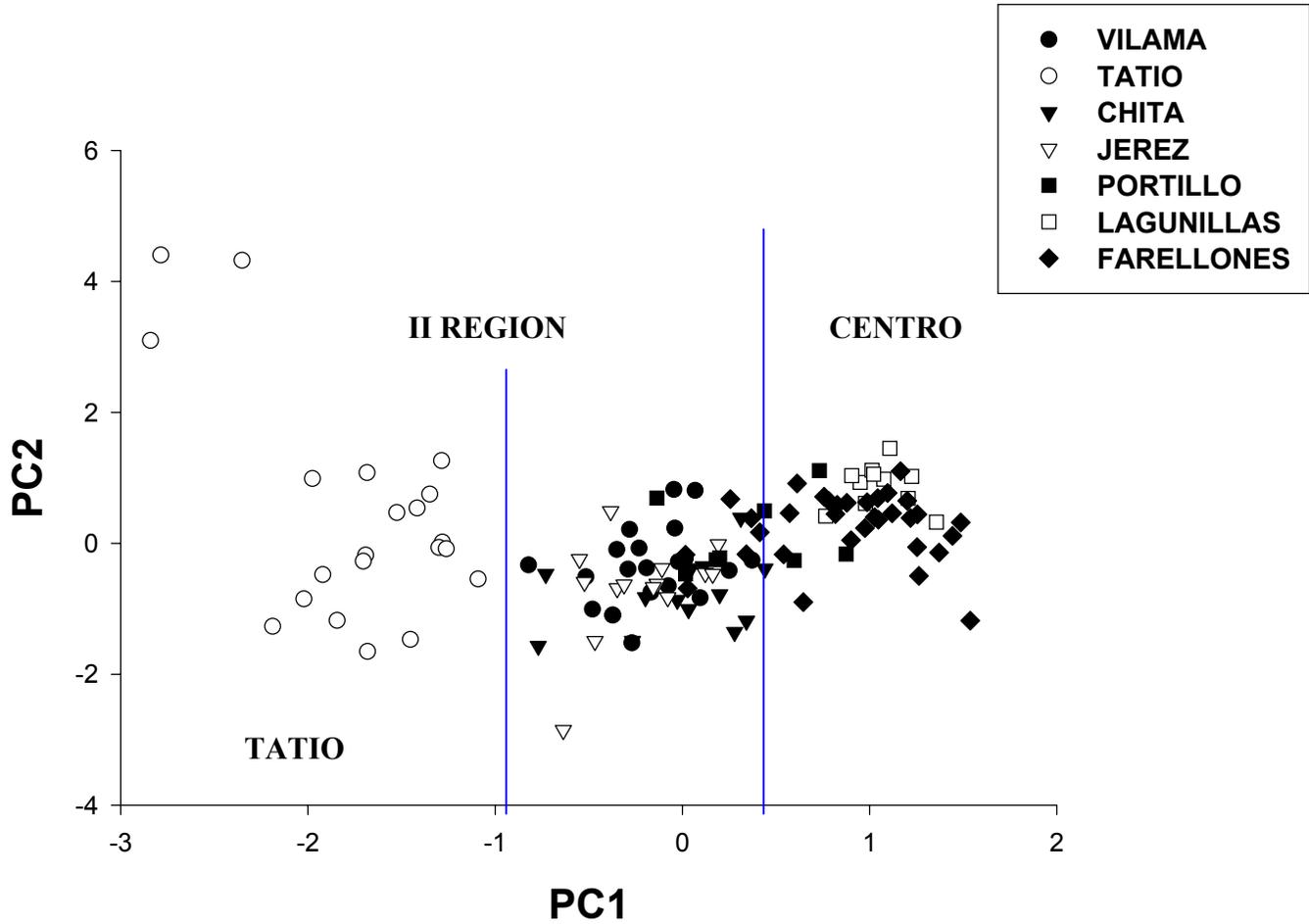


Figura 5: Representación de la variación morfológica en *Bufo spinulosus* generado a partir de los dos primeros ejes del análisis de Componentes Principales (PCA).

TABLA 7

	Vilama	Tatio	C.Chita	Q.Jerez	Portillo	Lagun.	Farell.	N
Vilama	23.8	0	38.1	28.6	9.5	0	0	21
Tatio	0	100.0	0	0	0	0	0	18
C.Chita	15.4	0	53.8	15.4	15.4	0	0	13
Q.Jerez	42.9	0	42.9	14.2	0	0	0	14
Portillo	0	0	12.5	0	50.0	0	37.5	8
Lagun.	0	0	0	0	0	81.8	18.2	11
Farell.	0	0	3.0	3.0	18.2	15.2	60.6	33

(Wilk's lambda = 0.075; F = 25.674; g.l. = 18; 308 p < 0.0001)

Tabla 7: Matriz de clasificación obtenida a partir del Análisis de Función Discriminante (DFA), utilizando la localidad de procedencia como factor de agrupamiento. Los resultados se presentan en porcentaje: en filas se muestra la clasificación de casos y las categorías en columnas; en negrita se muestran porcentajes de individuos correctamente clasificados.

N = número de individuos analizados en cada localidad.

Análisis genético poblacional

En la Figura 6 se muestran los perfiles de los productos de RAPD-PCR con cada uno de los partidores utilizados en el análisis genético. Los patrones de las bandas analizadas con cada uno de los partidores y los tamaños de las mismas se detallan en el Anexo I.

Como resultado del análisis de los productos del RAPD-PCR se obtuvo un total de 84 bandas polimórficas en las siete poblaciones estudiadas de *Bufo spinulosus*, las que presentan tamaños entre 280 y 1500 pb. Al aplicar la corrección sugerida por Lynch y Milligan (1994), manteniendo solamente las bandas que presentan una frecuencia menor a $1 - 3/N$, el análisis queda reducido a 64 bandas (Anexo I). Ambos grupos de datos fueron utilizados para el análisis genético poblacional.

En el Anexo II se muestran las frecuencias alélicas observadas en cada una de las poblaciones estudiadas. A partir de estos análisis, se puede observar que el porcentaje de loci polimórficos observado en las siete poblaciones de *B. spinulosus* presentan valores que van desde un 11.9 % a 36.9 % con la totalidad de loci analizados (Tabla 8), mientras que los resultados obtenidos al eliminar las bandas con frecuencia menor a $3/N$ en los alelos nulos muestran valores de polimorfismo ligeramente mayores que varían entre 14.1 % a 43,8 % (Tabla 9). En ambos casos la población de Lagunillas presenta los valores más bajos de polimorfismo. El polimorfismo observado entre grupos norte-centro presenta valores sobre un 50% en ambos casos, mientras que todas las poblaciones presentan sobre un 85 % de polimorfismo con todos los loci, y un 100 % de polimorfismo al aplicar la corrección de Lynch y Milligan (Tablas 8 y 9). La aplicación

de esta tiene como efecto un aumento en los niveles de polimorfismo, ya que elimina los loci monomórficos, además de aquellos en los cuales los alelos presentan frecuencias bajas como ocurre con alelos raros.

FIGURA 6

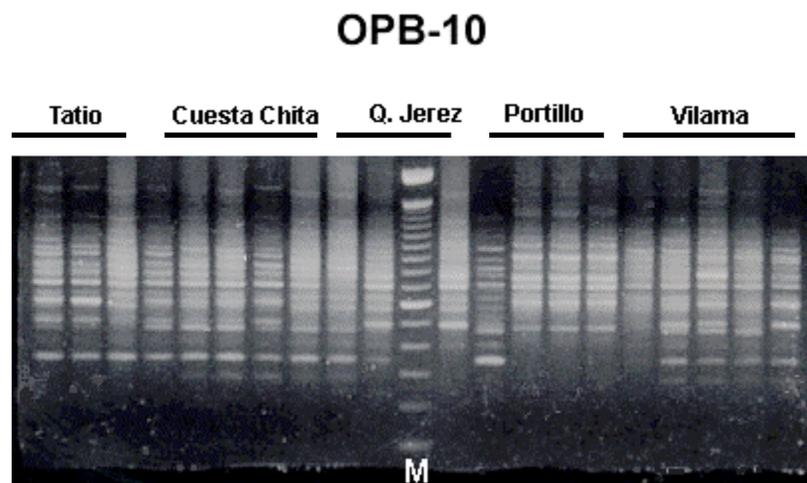
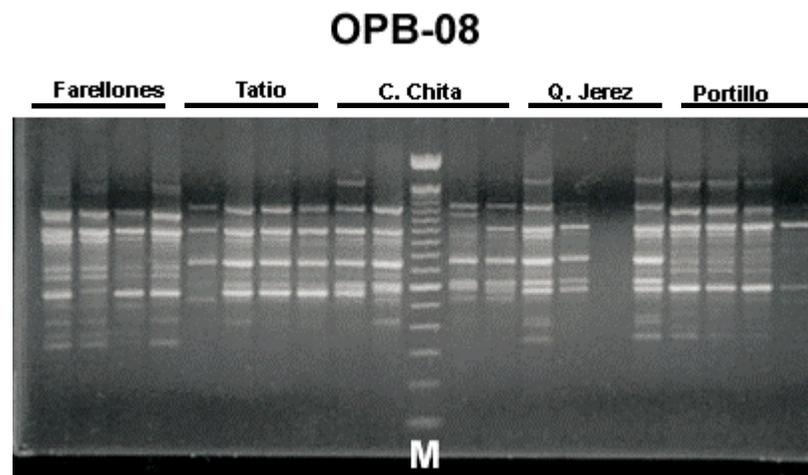
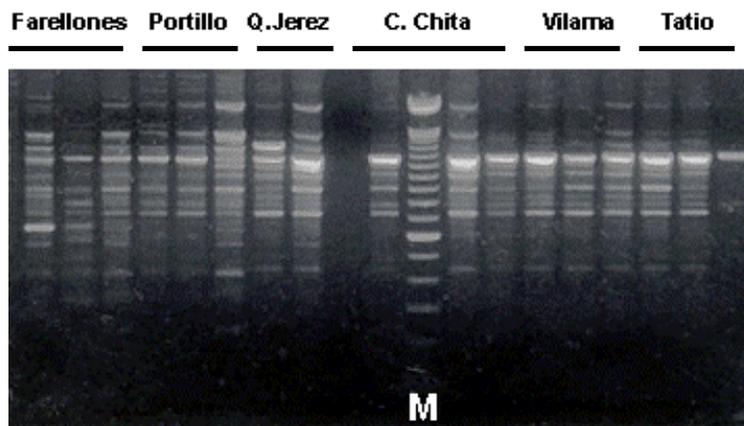


Figura 6: Perfiles de los productos RAPD-PCR en poblaciones de *Bufo spinulosus*.

FIGURA 6
(Continuación)

OPB-11



OPG-05

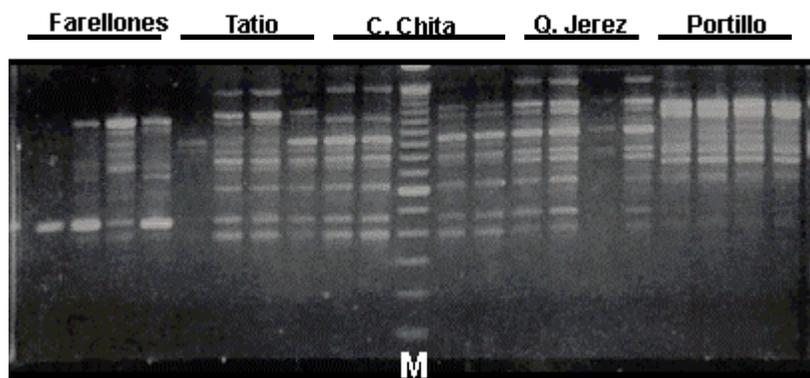
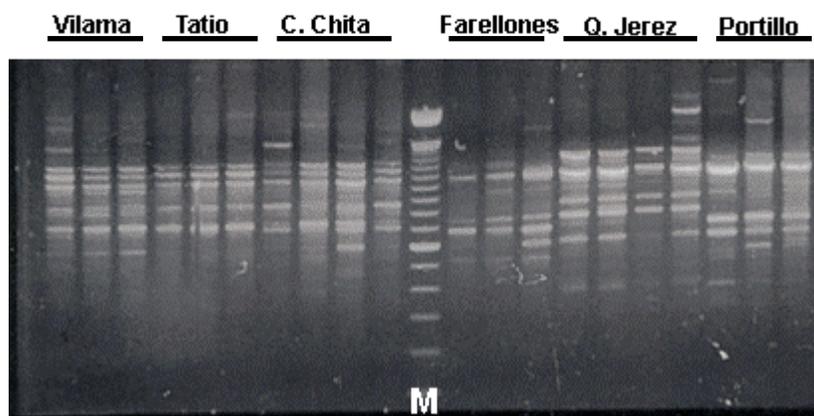


FIGURA 6
(Continuación)

OPG-06



OPG-14

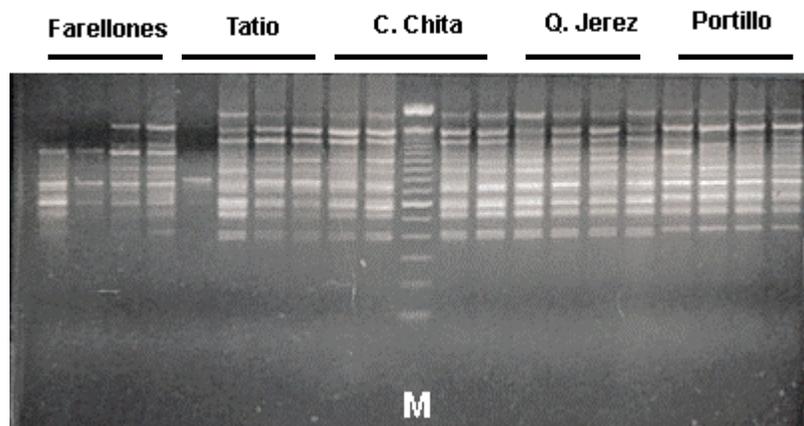


TABLA 8

Poblacion	Tamaño muestra (N)	N° loci polimorficos	% de loci polimórficos
Farellones	10	23	27.38
Portillo	10	28	33.33
Lagunillas	4	10	11.90
Q. Jerez	10	24	28.57
Tatio	10	29	34.52
Vilama	10	31	36.90
C. Chita	10	24	28.57
Grupos			
Centro	24	42	50.00
Norte	40	48	57.14
Total	64	73	86.90

Tabla 8: Polimorfismo y porcentaje de loci polimórficos presentes en poblaciones de *B. spinulosus* en Chile (se consideran todos los alelos y poblaciones).

TABLA 9

Poblacion	Tamaño muestra (N)	N° loci polimorficos	% de loci polimórficos
Farellones	10	20	31.25
Portillo	10	26	40.62
Lagunillas	4	9	14.06
Q. Jerez	10	23	35.94
Tatio	10	26	40.62
Vilama	10	28	43.75
C. Chita	10	23	35.94
Grupos			
Centro	24	39	60.94
Norte	40	42	65.62
Total	64	64	100.00

Tabla 9: Polimorfismo y porcentaje de loci polimórficos presentes en poblaciones de *B. spinulosus* en Chile. Los datos fueron corregidos según criterio de Lynch y Milligan (1994).

Por otra parte, el análisis genético poblacional permite observar valores de G_{st} (análogo al F_{st} de Wright utilizado en marcadores codominantes) dentro de las regiones estudiadas (Centro y Norte) fueron de 0.4138 y 0.3299 respectivamente, mientras que en todas las poblaciones el valor de G_{st} es de 0.4711 (Tabla 10), dando cuenta así de una alta estructuración genética en las poblaciones estudiadas, según el criterio de Hartl y Clark (1997). El mismo análisis considerando sólo los alelos con frecuencias menores a $1-3/N$ muestran valores levemente mayores que en el caso anterior (0.4423, 0.3348 y 0.4893 en el centro, norte y total respectivamente). El mismo análisis para obtener los

valores de G_{st} y Flujo génico realizado entre pares de poblaciones, de forma de visualizar el efecto que cada una de estas combinaciones aportan a los niveles de variabilidad observado entre regiones y entre el total de las subpoblaciones, varían entre 0.135 y 0.744, mientras que los valores estimados de flujo genético (N_m) van desde 0.172 a 3.211 (Tabla 11a). Los valores de G_{st} muestran la existencia de una diferenciación genética alta y muy alta entre las poblaciones estudiadas, siendo esta diferenciación inferior sólo entre las poblaciones de C.Chita y Vilama, donde el valor de G_{st} (0.135) establece una diferenciación genética moderada (Hartl & Clark, 1997) y los niveles de flujo genético son los más altos que se observan. Por su parte, los valores de G_{st} y N_m para la corrección de Lynch y Milligan, muestran valores similares a los anteriormente descritos (G_{st} 0.137 a 0.758; N_m 0.160 a 3.143; Tabla 11b). De esta forma, se puede ver que los valores de G_{st} son menores entre las poblaciones más cercanas de la II región (Vilama, C. Chita y El Tatio).

Tabla 10

Datos Totales	Ht	Hs	Gst	Nm
Centro	0.1400 (0.0302)	0.0820 (0.0125)	0.4138	0.7082
Norte	0.1837 (0.0359)	0.1231 (0.0188)	0.3299	1.0157
Total	0.3119 (0.0341)	0.1649 (0.0184)	0.4711	0.5614

Datos Corregidos según Lynch y Milligan (1994)	Ht	Hs	Gst	Nm
Centro	0.1682 (0.0313)	0.0938 (0.0116)	0.4423	0.6305
Norte	0.2218 (0.0377)	0.1476 (0.0202)	0.3348	0.9936
Total	0.3893 (0.0172)	0.1988 (0.0178)	0.4893	0.5219

Tabla 10: Valores de Ht, Hs, Gst y Nm en regiones (Centro y Norte), y en el conjunto de poblaciones en *Bufo spinulosus* utilizando los datos totales y corregidos. Para Ht y Hs se muestran los promedios y la desviación estandar entre paréntesis. Nm = estimación de flujo génico a partir de valores de Gst (McDermott & McDonald, 1993).

TABLA 11

a)

	TATIO	C.CHITA	VILAMA	Q.JEREZ	PORTILLO	FARELLONES	LAGUNILLAS
TATIO	*	0.226	0.167	0.314	0.583	0.612	0.682
C.CHITA	1.713	*	0.135	0.353	0.603	0.620	0.723
VILAMA	2.488	3.211	*	0.286	0.565	0.585	0.658
Q.JEREZ	1.090	0.915	1.251	*	0.626	0.658	0.744
PORTILLO	0.357	0.329	0.385	0.298	*	0.277	0.396
FARELLONES	0.317	0.306	0.355	0.260	1.302	*	0.377
LAGUNILLAS	0.233	0.191	0.260	0.172	0.762	0.825	*

b)

	TATIO	C.CHITA	VILAMA	Q.JEREZ	PORTILLO	FARELLONES	LAGUNILLAS
TATIO	*	0.221	0.156	0.318	0.604	0.641	0.706
C.CHITA	1.763	*	0.137	0.365	0.617	0.641	0.736
VILAMA	2.711	3.143	*	0.299	0.586	0.613	0.680
Q.JEREZ	1.070	0.870	1.173	*	0.642	0.682	0.758
PORTILLO	0.327	0.310	0.353	0.278	*	0.302	0.419
FARELLONES	0.280	0.280	0.316	0.234	1.156	*	0.411
LAGUNILLAS	0.209	0.180	0.236	0.160	0.692	0.718	*

Tabla 11: Valores de G_{st} (sobre la diagonal) y N_m (bajo la diagonal) entre poblaciones de *Bufo spinulosus*: a) análisis utilizando todos los loci y poblaciones; b) corregidas según criterio de Lynch & Milligan (1994) para poblaciones con alelos nulos $< 3/N$. Sobre la diagonal se muestran los valores de G_{st} y bajo la diagonal los valores estimados de flujo génico (N_m) a partir de valores de G_{st} .

La construcción de un dendrograma con el método UPGMA a partir de los valores de distancia genética de Nei corregida (Tabla 12) utilizando los 84 loci muestra dos grupos: un grupo con las poblaciones de Chile central y otro con las poblaciones del norte del país (Figura 7). En el primer caso se aprecia que las poblaciones de Lagunillas y Farellones son genéticamente más cercanas entre sí, quedando separada la población de Portillo, mientras que en las poblaciones de la II región son las poblaciones de Vilama y Cuesta de Chita las más cercanas. Además se observa que la población de Quebrada de Jerez es la que presenta un valor de distancia genética mayor respecto al resto de las poblaciones del norte.

TABLA 12

	Farellones	Portillo	Lagunillas	Q.Jerez	Tatio	Vilama	C.Chita
Farellones	-	0.9181	0.9186	0.6170	0.5962	0.6152	0.6252
Portillo	0.0855	-	0.8971	0.6268	0.6074	0.6122	0.6142
Lagunillas	0.0849	0.1085	-	0.5950	0.5861	0.5978	0.5585
Q.Jerez	0.4829	0.4671	0.5193	-	0.8892	0.8978	0.8803
Tatio	0.5171	0.4985	0.5343	0.1174	-	0.9410	0.9230
Vilama	0.4859	0.4907	0.5145	0.1078	0.0608	-	0.9602
C.Chita	0.4697	0.4875	0.5825	0.1275	0.0802	0.0406	-

Tabla 12: Medidas de identidad y distancia genética de Nei corregidas (Nei, 1978). Sobre la diagonal se muestran los valores de identidad genética, y bajo la diagonal los valores de distancia genética

El análisis utilizando 64 loci y el dendrograma obtenido de las mismas, muestra la misma topología que el árbol obtenido con la totalidad de los datos (Tabla 13; Figura 8); se mantiene el mismo patrón centro-norte y la mayor distancia genética de la población de Jerez respecto a las demás poblaciones del norte del país.

TABLA 13

	Farellones	Portillo	Lagunillas	Q.Jerez	Tatio	Vilama	C.Chita
Farellones	-	0.8914	0.8950	0.4946	0.4757	0.4936	0.5032
Portillo	0.1150	-	0.8643	0.5022	0.4849	0.4838	0.4826
Lagunillas	0.1109	0.1458	-	0.4653	0.4618	0.4702	0.4140
Q.Jerez	0.7040	0.6887	0.7650	-	0.8626	0.8647	0.8377
Tatio	0.7430	0.7238	0.7726	0.1478	-	0.9360	0.9078
Vilama	0.7059	0.7261	0.7546	0.1454	0.0661	-	0.9487
C.Chita	0.6867	0.7286	0.8819	0.1771	0.0968	0.0526	-

Tabla 13: Medidas de identidad y distancia genética de Nei, eliminando alelos nulos menores a 3/N (Lynch & Milligan, 1994). Sobre la diagonal se muestran los valores de identidad genética, y bajo la diagonal los valores de distancia genética

FIGURA 7

Dendrograma obtenido en poblaciones de *Bufo spinulosus*.
Distancia genética de Nei, 1978 (84 loci).

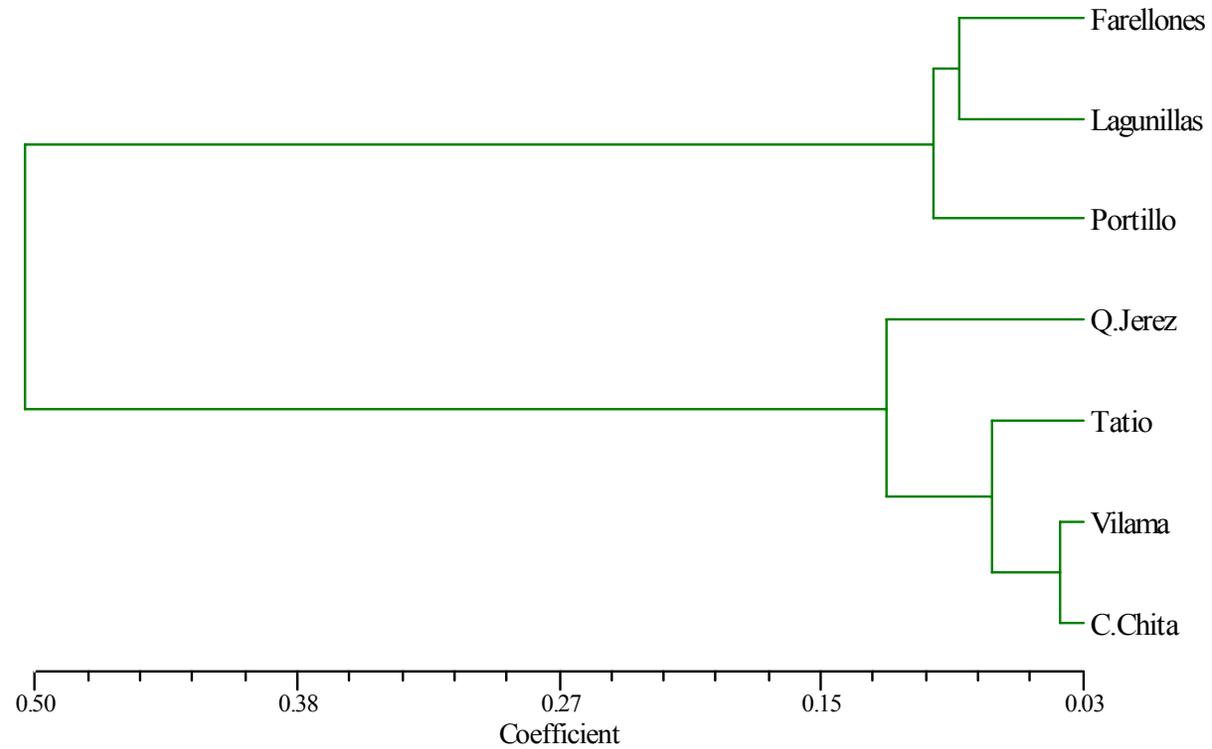


Figura 7: Arbol UPGMA obtenido con distancia de Nei corregida (Nei, 1978) que muestra las relaciones entre poblaciones de *Bufo spinulosus* estudiadas utilizando 84 loci.

Dendrograma obtenido en poblaciones de *Bufo spinulosus*.
 Distancia genética de Nei, 1978 (64 loci, corregidos según Lynch y Milligan, 1994).

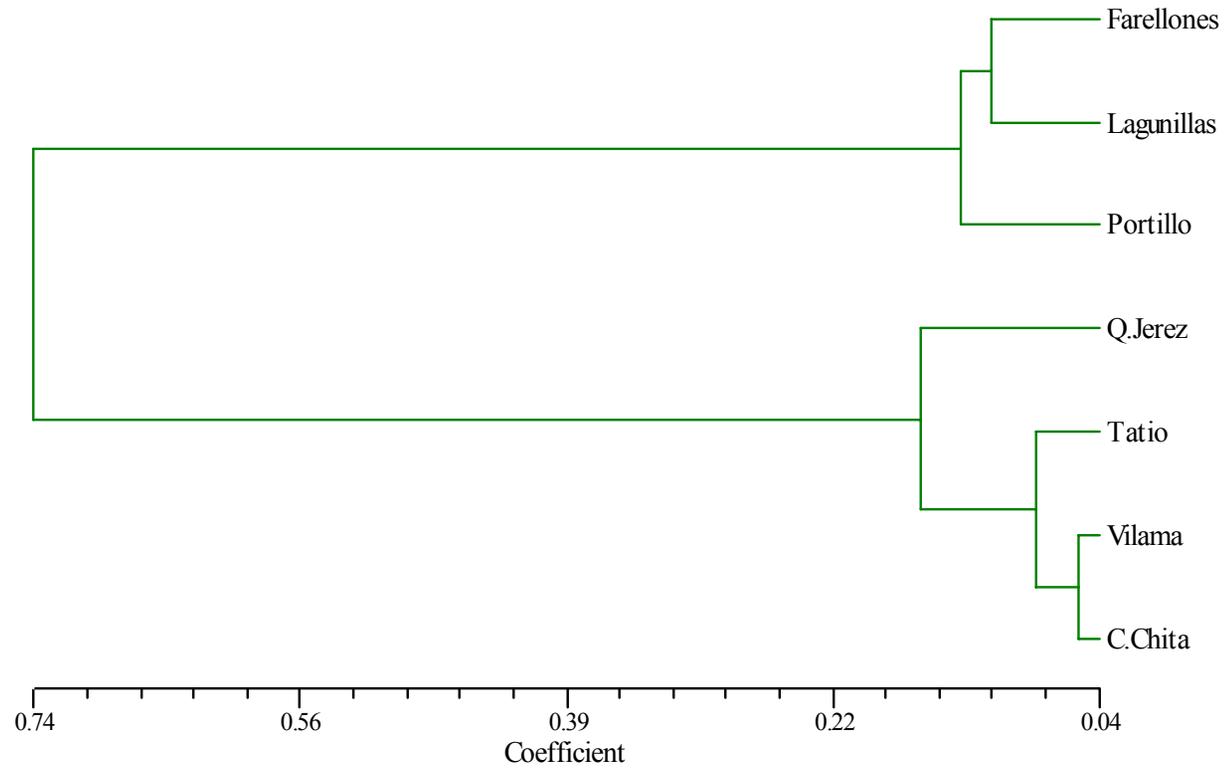


Figura 8: Arbol UPGMA obtenido con distancia de Nei corregida (Nei, 1978) que muestra las relaciones entre poblaciones de *Bufo spinulosus* estudiadas utilizando 64 loci (corregidos según Lynch y Milligan, 1994).

Análisis molecular (RAPD-PCR)

La construcción de árboles UPGMA utilizando el programa NTSys permiten visualizar las relaciones de los individuos analizados obtenidos a partir de la medida de distancia de genética de Nei (Figuras 9 y 10). Estos árboles muestran que a nivel genético individual sigue existiendo una diferenciación entre las poblaciones del Norte y Centro del país con un valor de Bootstrap de un 100 % en el nodo que separa a ambos grupos, quedando agrupadas las poblaciones de Lagunillas, Portillo y Farellones como un clado, pero conservando cada población su identidad. En el caso de las poblaciones del norte, los individuos de la población de Q. de Jerez presentan una gran identidad como grupo (sobre el 60 % al aplicar el bootstrap), quedando juntos en un grupo independiente del resto de los individuos pertenecientes a las poblaciones de El Tatio, Vilama y Chita, las que no se diferencian genéticamente entre si. En las Figuras 9 y 10 se muestran además los nodos con valores de bootstrap mayores al 50 %.

Al realizar un Análisis de Coordenadas Principales (PCo) se puede confirmar nuevamente el patrón observado en los árboles UPGMA: las poblaciones del centro del país quedan completamente separadas de la II región, aunque no diferenciadas entre si, y nuevamente la población de Quebrada de Jerez es la única que muestra identidad como grupo, encontrándose sobreposición entre el resto de individuos del norte, aunque se puede hacer notar que los individuos 4, 5 y 9 de la población de El Tatio (Tat4, Tat5 y Tat9) presentan una diferenciación en el eje Z respecto a los demás individuos (Figura 11). En este análisis los valores propios (eigenvalues) de los primeros tres ejes muestran valores de 37.89%, 6.65 % y 5.35% respectivamente, explicando en su conjunto un

49.89% de la variación observada en el gráfico de la figura 11. El mismo análisis utilizando la corrección para alelos nulos menores a $3/N$ permite confirmar el patrón norte-centro, diferenciándose la población de Farellones con relación a las poblaciones de Portillo y Lagunillas (Figura 12). En las poblaciones de la segunda región mantiene su diferenciación la población de Q. de Jerez, mientras que los individuos de El Tatio, Cuesta de Chita y Vilama se presentan como un conglomerado no diferenciado. Los valores propios en este caso son levemente mayores (42.82%, 7.54% y 5.09% respectivamente) explicando un 55.45% de la variación genética observada.

FIGURA 10

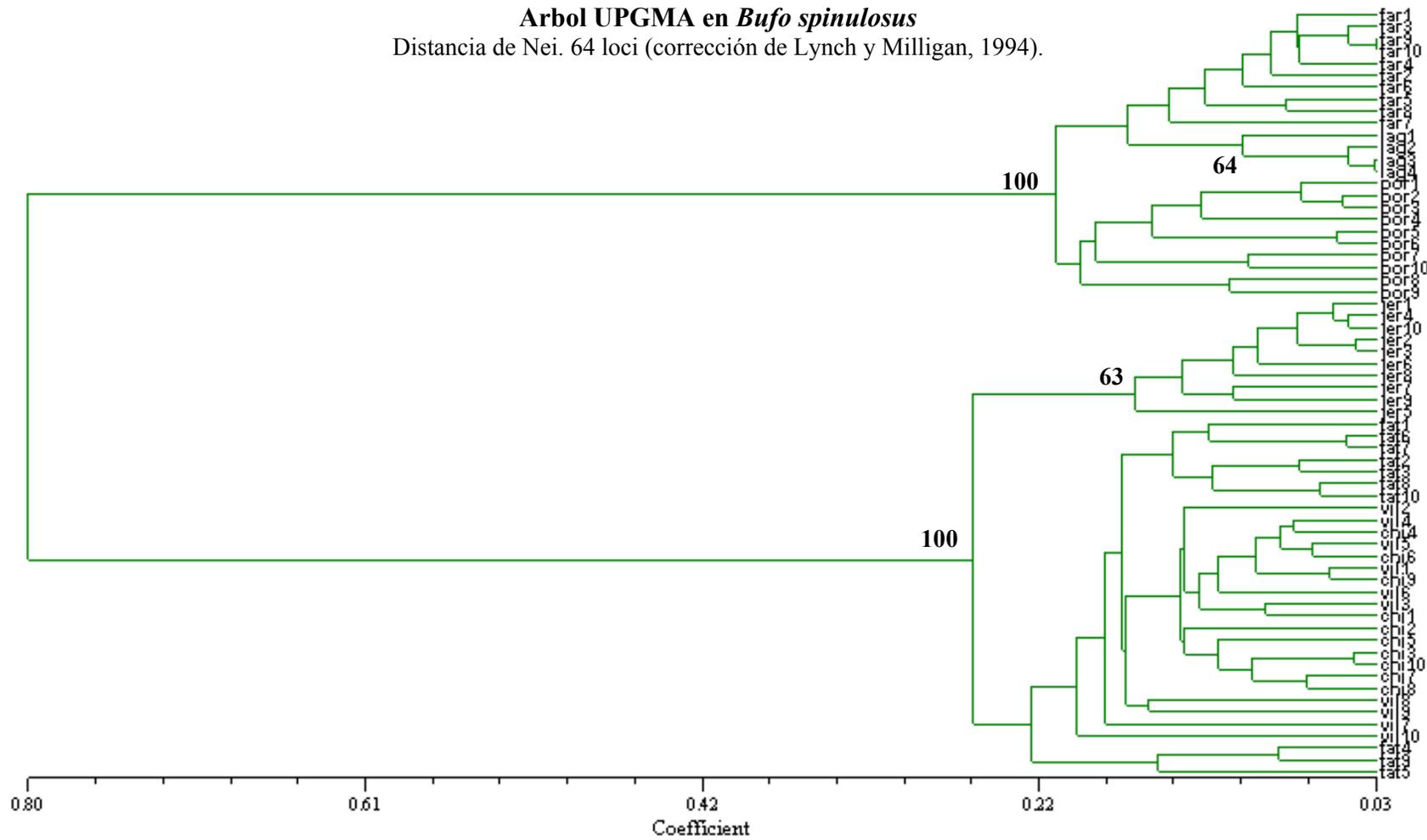


Figura 10: Arbol UPGMA obtenido con 64 loci mediante RAPD. En los nodos se muestran valores de bootstrap > al 50 %.

FIGURA 11

**Análisis de Coordenadas Principales (PCo)
en poblaciones de *Bufo spinulosus* (84 loci).**

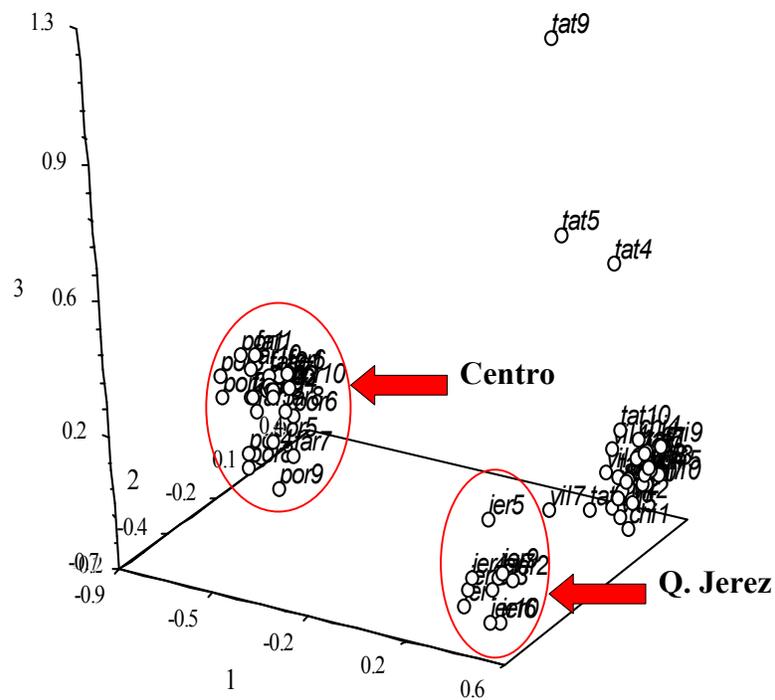


Figura 11: Análisis de Coordenadas Principales (PCo) en poblaciones de *Bufo spinulosus* utilizando 84 loci. Se aprecia la diferenciación entre las poblaciones del norte y centro del país, mientras que a nivel local se observa la gran identidad que la población de Q. de Jerez presenta como grupo. Individuos 4, 5 y 9 de El Tatio presentan diferencias respecto a los demás individuos de la II Región.

FIGURA 12

**Análisis de Coordenadas Principales (PCo)
en poblaciones de *Bufo spinulosus* (64 loci).**

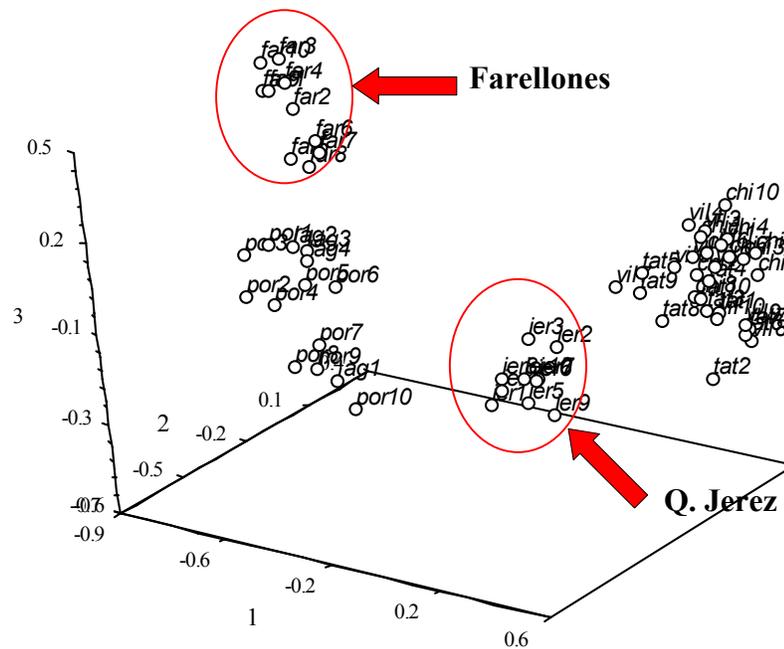


Figura 12: Análisis de Coordenadas Principales (PCo) en poblaciones de *Bufo spinulosus* utilizando 64 loci (corregidos según Lynch y Milligan, 1994). Se aprecia la diferenciación entre las poblaciones del norte y centro del país, mientras que a nivel local se observa la diferenciación de las poblaciones de Farellones y Q. de Jerez.

Correlación Entre Factores Genéticos-Morfológicos

A partir de los valores de distancia genética de Nei, valores canónicos obtenidos del análisis discriminante en la morfometría, distancias geográficas, diferencias entre alturas y temperaturas del agua de cada localidad, se calcularon las distancias Euclidianas para cada una de estas variables (Tabla 14).

La comparación de los árboles UPGMA obtenidos de las distancias Euclidianas de los datos genéticos y morfológicos muestran un desacople en los patrones de agrupamiento de ambas variables (Figura 13a y 13b). A nivel genético, como se ha observado en los análisis previos, se presenta diferenciación entre las poblaciones del norte y centro del país, lo que no ocurre a nivel morfométrico donde la población de El Tatio presenta la mayor divergencia respecto a las demás poblaciones. Con el fin de evaluar este desacople existente entre ambos niveles de análisis se realizó un Test de Mantel con el fin de probar en que grado es posible encontrar una correlación entre morfología y genética, y de esta forma evaluar el grado de asociación con otros factores, utilizando como variables la distancia geográfica, altitud y temperatura del agua de las distintas localidades estudiadas, y así inferir el efecto que estarían explicando en el patrón observado en ambos niveles de estudio. Cuando se consideran todas las poblaciones en el análisis se observa una correlación positiva entre morfología y todas las variables estudiadas, aunque la asociación de esta variable con la distancia geográfica y genética presenta valores bajos de r (0.386 y 0.361 respectivamente; Tabla 15). Por su parte, la variable genética presenta una gran asociación con distancia geográfica con un

valor de $r = 0.998$. Realizando el mismo análisis, pero esta vez excluyendo a la población del Tatio, se encuentra que la asociación existente entre morfología-altitud y morfología-temperatura del agua no son significativas, mientras que la variable genética mantiene su asociación altamente significativa con distancia geográfica ($r = 0.997$). Sin embargo, los valores de r entre las matrices de morfología-distancia geográfica y morfología-genética son mucho mayores (0.806 y 0.789, respectivamente), explicando en mejor forma la asociación entre estas variables cuando no se considera a la población de El Tatio (Tabla 15).

TABLA 14

DISTANCIA MORFOLOGICA

	VILAMA	TATIO	CHITA	Q.JEREZ	PORTILLO	FARELLONES	LAGUNILLAS
VILAMA	0.000	4.623	0.459	0.424	2.229	4.252	3.371
TATIO	11.174	0.000	4.974	4.372	5.894	8.209	7.500
CHITA	1.026	11.616	0.000	0.759	1.899	3.915	2.955
Q.JEREZ	0.725	10.918	1.408	0.000	2.185	4.259	3.472
PORTILLO	4.777	12.508	4.121	4.785	0.000	2.477	1.654
FARELLONES	8.913	13.579	8.389	8.934	5.490	0.000	1.444
LAGUNILLAS	7.398	13.516	6.771	7.457	3.633	2.769	0.000

DISTANCIA GENETICA (NEI)

	VILAMA	TATIO	CHITA	Q.JEREZ	PORTILLO	FARELLONES	LAGUNILLAS
VILAMA	0.000	0.066	0.053	0.145	0.726	0.706	0.755
TATIO	0.111	0.000	0.097	0.148	0.724	0.743	0.773
CHITA	0.155	0.187	0.000	0.177	0.729	0.687	0.882
Q.JEREZ	0.257	0.243	0.299	0.000	0.689	0.704	0.765
PORTILLO	1.720	1.721	1.743	1.628	0.000	0.115	0.146
FARELLONES	1.719	1.726	1.742	1.636	0.174	0.000	0.111
LAGUNILLAS	1.844	1.844	1.877	1.754	0.274	0.266	0.000

DISTANCIA GEOGRAFICA (Kms).

	VILAMA	TATIO	C.CHITA	Q.JEREZ	PORTILLO	FARELLONES	LAGUNILLAS
VILAMA	0.000	61.010	49.950	40.720	1128.500	1184.250	1211.230
TATIO	149.557	0.000	18.250	94.490	1189.140	1244.910	1271.810
CHITA	127.884	34.805	0.000	87.760	1177.920	1233.650	1260.630
Q.JEREZ	94.393	220.807	202.754	0.000	1096.660	1152.470	1179.300
PORTILLO	2958.336	3023.642	3016.557	2894.533	0.000	55.840	83.660
FARELLONES	3064.670	3128.423	3121.698	3001.223	147.228	0.000	28.880
LAGUNILLAS	3096.591	3158.978	3152.570	3033.467	205.119	73.085	0.000

TABLA 14 (Continuación)

ALTURA

	VILAMA	TATIO	C.CHITA	Q.JEREZ	PORTILLO	FARELLONES	LAGUNILLAS
VILAMA	0.000	1685.000	1162.000	66.000	460.000	248.000	337.000
TATIO	4176.562	0.000	523.000	1751.000	2145.000	1933.000	2022.000
CHITA	3074.363	1383.728	0.000	1228.000	1622.000	1410.000	1499.000
Q.JEREZ	174.620	4295.136	3201.425	0.000	394.000	182.000	271.000
PORTILLO	1000.538	4507.768	3522.725	893.859	0.000	212.000	123.000
FARELLONES	618.450	4501.051	3445.288	481.527	520.404	0.000	89.000
LAGUNILLAS	796.964	4541.571	3511.342	670.295	325.427	235.472	0.000

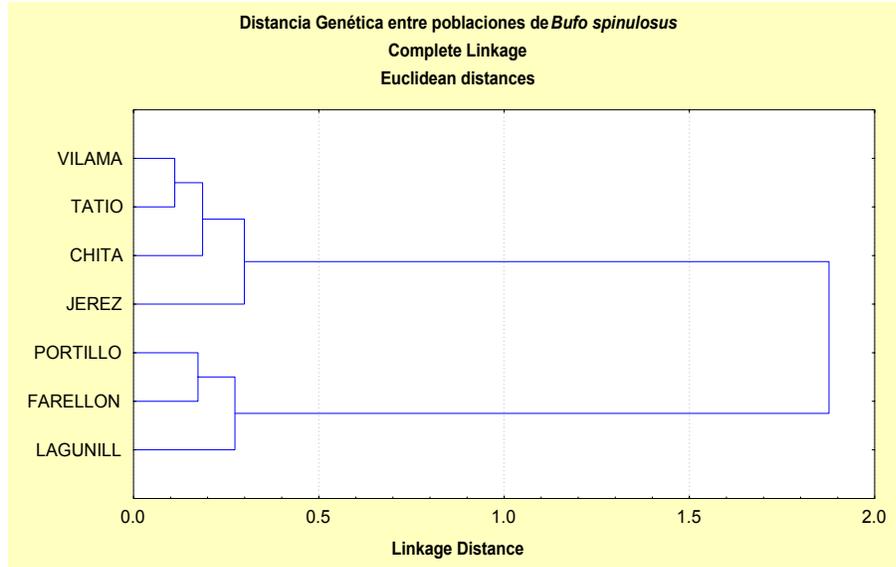
TEMPERATURA AGUA

	VILAMA	TATIO	C.CHITA	Q.JEREZ	PORTILLO	FARELLONES	LAGUNILLAS
VILAMA	0.000	8.300	6.200	1.500	8.700	11.000	8.700
TATIO	19.938	0.000	14.500	6.800	17.000	16.000	17.000
CHITA	17.913	32.503	0.000	7.700	2.500	1.500	2.500
Q.JEREZ	4.091	17.991	19.438	0.000	10.200	9.200	10.200
PORTILLO	22.184	35.323	6.144	23.712	0.000	1.000	0.000
FARELLONES	22.389	34.728	6.045	23.492	3.360	0.000	1.000
LAGUNILLAS	22.184	35.323	6.144	23.712	0.000	3.360	0.000

Tabla 14: Matrices de distancias (sobre la diagonal) y distancias euclidianas (bajo la diagonal) obtenidas a partir de datos morfométricos, genéticos y ambientales entre poblaciones de *Bufo spinulosus*.

FIGURA 13

a)



b)

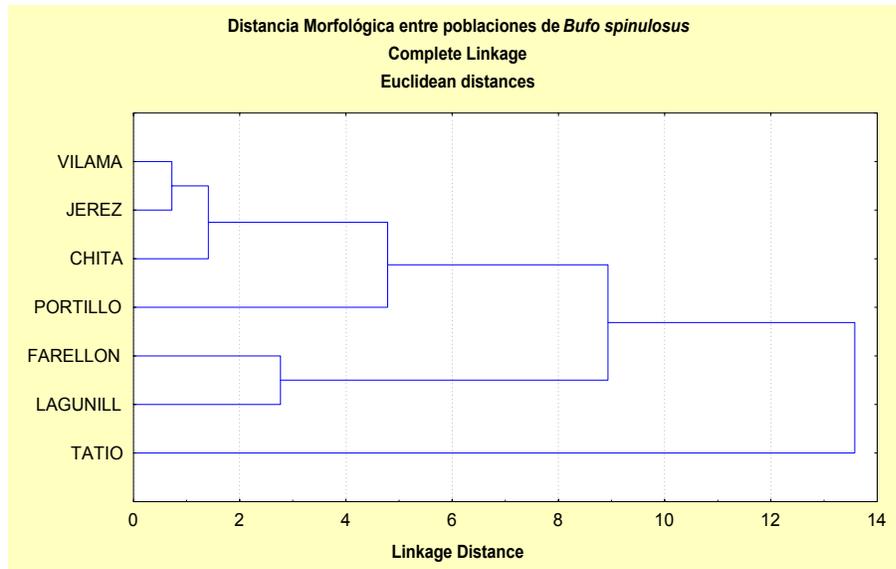


Figura 13: Agrupamiento de caracteres (Cluster): (a) genéticos obtenidos de distancia genética de Nei utilizando corrección de Lynch; (b) morfométricos obtenidos a partir de coeficientes canónicos a partir de DFA. Los agrupamientos se generaron en función de la procedencia geográfica, utilizando la distancia Euclidiana y amalgamación completa (complete linkage) como criterio de agrupamiento.

TABLA 15

MATRIZ 1	MATRIZ 2	TODAS LAS POBLACIONES			SIN POBLACIÓN EL TATIO		
		g	P	r	g	P	r
GENDIST	GEODIST	3.994	**	0.998	3.002	**	0.997
MORFDIST	GEODIST	2.431	**	0.386	2.809	**	0.806
MORFDIST	GENDIST	2.231	**	0.361	2.752	**	0.789
MORFDIST	ALTDIST	1.740	*	0.501	-0.398	n.s.	-0.091
MORFDIST	TEMPDIST	2.666	**	0.682	1.227	n.s.	0.329

Tabla 15: Test de Mantel (Mantel, 1997) entre distancias Euclidianas para variables morfométricas, genéticas y ambientales: Ho indica que no hay asociación entre elementos en las matrices de distancia Euclidiana 1 y 2.

Niveles de significancia:

$p < 0.05 = *$

$p < 0.005 = **$

no significativo = n.s.

DISCUSION

El estudio realizado en este trabajo analizando caracteres morfológicos y marcadores moleculares (RAPD), permite confirmar la diferenciación entre las poblaciones bajo un modelo de aislamiento por distancia entre las poblaciones de *Bufo spinulosus* del norte y centro del país, en especial si se considera la discontinuidad entre las mismas por la presencia de condiciones desérticas imperantes entre ellas. Puesto que la distribución de este anfibio se restringe principalmente a la zona Andina y alto Andina, con una componente muy seca dado por la penetración de condiciones desérticas en altura en la zona norte, las que se caracterizan por presentar escasas precipitaciones, mientras que en su distribución más meridional, las poblaciones se encuentran frente a un régimen de clima mediterráneo (Villagrán *et al.*, 1983), Cei postuló ya en el año 1962 la existencia de un aislamiento geográfico absoluto entre las poblaciones de *B. spinulosus* de la cordillera de Chile central y las poblaciones del Norte grande, mediado por las condiciones desérticas del altiplano que se extienden desde Antofagasta hasta San Antonio de los Cobres (Salta, Argentina).

Pese a que no se tiene conocimiento de la existencia de poblaciones de *Bufo spinulosus* entre los 25° y 30° de latitud sur, se puede pensar en la existencia de un continuo de poblaciones basado en la presencia de esta especie en la región alto-andina Argentina, aunque no existen antecedentes de corredores andinos que permitan confirmar esta hipótesis. La presencia de poblaciones de *B. spinulosus* en poblaciones Argentinas en la región cordillerana y precordillerana desde el norte de la provincia de Jujuy hasta el límite de la provincia de Mendoza (Cei, 1980), permiten suponer un

continuo de poblaciones en la vertiente oriental de la cordillera de los Andes. Por otra parte, la falta de estudios y prospecciones en la zona chilena antes mencionada (III y IV regiones), no permiten descartar la existencia de poblaciones de *B. spinulosus* en esta área.

Diversos estudios han estado enfocados a investigar los posibles agentes causales de la variación morfológica en función del rango geográfico que presentan algunas especies de bufónidos (Bertini *et al.*, 1960; Matthews, 1975; Mendelson, 1998; Castellano *et al.*, 2000), donde la principal explicación de los patrones de variación morfológica se enfoca a la correlación de esta con la distancia geográfica, a lo que se agrega siempre una componente ambiental dada por la diversidad de ambientes en que estas especies habitan. En el caso de *Bufo spinulosus*, cuya distribución puede ser considerada básicamente alto-andina, presenta algunas diferencias destacables en cuanto a los ambientes en que estas se encuentran presente. Así podemos ver que poblaciones presentes en el norte del país, como se señaló anteriormente, se encuentran sometidas a condiciones particularmente rígidas, mientras que en poblaciones del centro del país exhiben un régimen más estacional.

En cuanto a la variación observada en caracteres morfológicos en *B. spinulosus*, se pudo encontrar un patrón norte-sur respecto al tamaño corporal, siendo los primeros los individuos significativamente más pequeños respecto a las poblaciones de Chile central (Figuras 4 y 5). En este sentido, Mendelson (1998) también observó una tendencia general de aumento del tamaño corporal en comparación con el aumento de la latitud al estudiar poblaciones de *Bufo valliceps*, un anfibio de amplia distribución en norteamérica. Este autor discute además el conflicto existente entre sus resultados y las

hipótesis respecto al efecto que tendrían los ambientes más áridos sobre el tamaño corporal. Según la literatura, anfibios presentes en ambientes más secos presentarían como adaptación tamaños mayores que le permitirían conseguir una razón de superficie-volumen favorable para evitar la pérdida de agua. Contrario a esto, este autor no encuentra correlación entre ambas variables, y por lo tanto no habría una relación directa entre el tamaño corporal y el gradiente de precipitación de las poblaciones. En este sentido, *B. spinulosus* presenta, también como tendencia, tamaños más pequeños en latitudes menores y en ambientes más áridos, como ocurre en la II región del país. En el caso particular de la población de El Tatio, cuyos individuos presentan un tamaño significativamente menor respecto a las demás poblaciones, muestran una alta identidad como grupo desde el punto de vista morfométrico. En este sentido, es necesario recalcar las condiciones singulares de esta localidad, donde puede encontrarse que el desarrollo larvario de *B. spinulosus* ocurre en aguas termales (25° C a 30° C) a diferencia de las demás localidades donde las temperaturas del agua son más bajas (18° C a 20° C), y por lo mismo presentan diferencias en otras variables, como por ejemplo concentración de oxígeno en el agua, siendo aproximadamente un tercio menor en El Tatio respecto al resto de las poblaciones (Benavides, comunicación personal). Además algunos estudios preliminares en larvas de *B. spinulosus* mantenidas en dos temperaturas diferentes han mostrado diferencias morfométricas en individuos postmetamórficos (Mendez, datos no publicados).

Desde el punto de vista genético es posible apreciar claramente la diferenciación Norte-Centro, confirmando el patrón que sugieren los datos morfométricos en esta

especie. En este sentido, el análisis de cluster permite observar un agrupamiento, por un lado, de las poblaciones de Farellones, Portillo y Lagunillas, mientras que Vilama, El Tatio, C. de Chita y Q. de Jerez se encuentran agrupadas en un 100 % de los casos después de realizar un bootstrap (Figuras 9 y 10). A nivel local el patrón de diferenciación en función de la distancia geográfica se puede apreciar también si se visualizan las poblaciones de la II región, donde la población de Quebrada de Jerez, siendo la más distante entre las estudiadas dentro de la región, muestra una gran identidad genética como grupo, encontrándose en un 63 % de los casos esta tendencia después de aplicar un bootstrap. Sin embargo, las tres poblaciones restantes (Tatio, Chita y Vilama) no logran diferenciarse genéticamente entre sí, observando incluso superposición entre los individuos estudiados. El análisis de Coordenadas Principales permite visualizar este patrón en cada uno de los individuos estudiados en las 7 poblaciones de *Bufo spinulosus*. Como se puede apreciar al utilizar todos los loci analizados, algunos individuos de la población del Tatio presentan mayor variación que el resto de los individuos (Tat4, Tat5 y Tat9; Figura 11), desapareciendo este ordenamiento al eliminar los loci con alelos nulos menores a $3/N$, correspondiendo a alelos raros que presentan una muy baja frecuencia, lo que permite pensar que esta variación de algunos individuos del Tatio podrían deberse a una diferenciación genética inicial que se encontraría presente a nivel local.

Por su parte, los estimadores de G_{st} permiten establecer una clara estructuración genética entre las regiones (Norte y Centro), y de la misma forma considerando todas las poblaciones estudiadas. Estos valores de G_{st} realizando el mismo análisis, esta vez entre pares de poblaciones, muestran que las tres poblaciones mencionadas

anteriormente (Tatio, Chita y Vilama) son los que presentan los valores más bajos en comparación con el centro del país, y por lo tanto mostrando los valores más altos de flujo genético entre ellas (Tabla 11), con un nivel de diferenciación genética moderada sólo entre las poblaciones de Vilama y Cuesta de Chita, encontrándose que la estimación de G_{st} entre las demás combinaciones caen dentro de un nivel de diferenciación genética alta (Hartl y Clark, 1997). La corrección realizada sobre los alelos nulos permiten observar niveles un poco menores de G_{st} entre las poblaciones del norte, aunque mantienen los niveles de diferenciación establecidos según el criterio descrito anteriormente. Aunque estos valores de flujo genético, en comparación con trabajos realizados en otros taxa (Lougheed *et al.*, 2000), muestran niveles de flujo genético bastante bajos entre poblaciones, incluso entre aquellas que presentan distancias menores a 100 kms, como es el caso de las poblaciones de El Tatio, Vilama y Cuesta de Chita, son bastante razonables si se considera que el desplazamiento de individuos entre poblaciones se presenta como un evento poco probable, especialmente tomando en cuenta las condiciones de aridez presentes en la zona y la gran dependencia de los anfibios en cuanto a recursos hídricos para su alimentación y para su reproducción. Para explicar estos valores de diferenciación mediante estimadores G_{st} y flujo genético se realizó una revisión de las cuencas hidrográficas en la región. Como resultado, no se pudieron encontrar conexiones entre los principales cursos de agua que se encuentran en las poblaciones estudiadas, lo cual no permite explicar el patrón observado. Por esto se hace necesario realizar un estudio de posibles conexiones entre cursos secundarios, y además estudiar los efectos que pueden tener fenómenos como el invierno altiplánico en esta zona que podrían ayudar a interpretar los resultados obtenidos.

Pese a lo anterior, Bossart y Prowell (1998) señalan que el análisis de los estimadores de estructura poblacional y de flujo genético a partir de métodos indirectos utilizando marcadores moleculares, deben ser analizados cuidadosamente bajo ciertos criterios, pues estos estimadores (G_{st} y N_m) podrían estar dando cuenta tanto de procesos actuales como de los procesos históricos en la evolución del grupo bajo estudio. En este contexto histórico, Cei (1967) señala que la diferenciación dentro de las especies del grupo *spinulosus* esta fuertemente asociada a la formación del relieve del cordón montañoso andino. Por lo tanto, es necesario introducir el conocimiento de la historia geológica en las regiones estudiadas, puesto que reconocer los fenómenos que tuvieron lugar en los distintos períodos pueden ayudar a explicar los patrones de composición y diversidad de la flora y fauna afectados por los cambios climáticos en el Cuaternario (Simpson, 1979).

Los eventos de migración, colonización y diferenciación, tanto en plantas como en animales que habitan en la cordillera de los Andes por sobre los 2000-3000 msnm, tendrían un comienzo solo desde fines del periodo Terciario (Simpson, 1979; Villagran *et al.*, 1983). En el norte de Chile se encuentra prácticamente ausente algún tipo vegetacional de importancia, observándose especies más bien xerofíticas y que se distribuyen en forma espaciada. Por otra parte, al sur del Trópico de capricornio se presentan cambios evidentes en el clima, con la debilitación del anticiclón del Pacífico que da paso a vientos provenientes desde el este, cambiando además el régimen de precipitaciones, aunque el aumento en la humedad del ambiente se ve principalmente reflejada en el invierno con un aumento en las lluvias, por lo que en la zona central de Chile se presenta un clima de características mediterráneas. En los andes del norte de

Chile (18°-28° S) se pueden encontrar prácticamente diez grados de latitud con presencia de desierto absoluto en bajas elevaciones (Villagran *et al.*, 1983), señalando que estas formaciones exhiben una gran variación en la aridez de la zona en sentido altitudinal y latitudinal, mientras que la presencia del desierto absoluto con un clima de extrema aridez, restringe la vegetación a los principales cursos de agua (río Lluta, río Azapa y río Loa) en los cuales también se ve restringido el hábitat de *Bufo spinulosus*. Así, la presencia de estas barreras permiten esclarecer el patrón norte-centro observado tanto a nivel genético como morfológico. Sin embargo, las disimilitudes encontradas entre valores de diferenciación genética (G_{st}) entre norte y centro, donde las primeras exhiben valores mayores para este parámetro respecto a poblaciones del centro del país estableciendo una mayor diferenciación se pueden explicar si se considera el modelo de aislamiento por distancia, con lo que se puede establecer que los valores mas bajos de diferenciación genética en el norte corresponden a poblaciones geográficamente mas cercanas a diferencia de lo que ocurre en las poblaciones del centro del país. De la misma forma, la revisión de las distancias genéticas de Nei, (Tablas 12 y 13) permiten ver que los valores más altos para estas se encuentran entre las localidades más distantes, como es de esperar, considerando las grandes distancias que separan a las poblaciones del norte y centro. A nivel local se observa la misma tendencia, principalmente en las poblaciones de la segunda región, donde la población de Quebrada de Jerez presenta una mayor diferenciación a nivel genético respecto a las poblaciones de El Tatio, Vilama y Cuesta de Chita, siendo concordante con los datos obtenidos en los análisis de cluster (Figuras 9 y 10) y de coordenadas principales (PCo, Figuras 11 y 12), lo que permite

establecer la estructuración genética bajo el modelo de aislamiento por distancia propuesto en la hipótesis.

En cuanto a los resultados obtenidos en *B. spinulosus* en el test de asociación entre variables morfométricas, genéticas y ambientales, estos muestran un considerable efecto de los componentes ambientales sobre los caracteres de morfología externa. Por su parte, la variación genética se ve claramente explicada por la correlación existente con la distancia geográfica ($p < 0.005$; $r = 0.998$ y 0.997 incluyendo y excluyendo a la población de El Tatio, respectivamente).

Al observar los árboles de UPGMA en caracteres genéticos y morfológicos a partir de las distancias Euclidianas, en los que se aprecia un desacople entre ambas variables (Figura 13), encontramos que la población de El Tatio sería la principal responsable de este patrón a nivel morfológico. Los resultados del test de Mantel muestran que esta presenta un correlato positivo con todos los caracteres ambientales evaluados, aunque con valores de r bajos al asociarlos con la distancia geográfica y distancia genética (0.386 y 0.361 respectivamente). El mismo estudio, excluyendo a la población de El Tatio, nos permite observar que la correlación de la morfología con las distancias genética y geográfica se ajustan de mejor forma, mientras que las variables ambientales (altitud y temperatura del agua) no presentan una asociación significativa con el resto de las poblaciones, con lo que se pueden reafirmar los efectos que estas variables ambientales estarían ejerciendo sobre la población de El Tatio, considerando que es la que se encuentra a una mayor altura (4264 msnm) y habitando a mayores temperaturas durante todo el año (25° - 30° C).

Además de esta falta de correspondencia entre las variables genéticas y morfológicas, como se discutió anteriormente, se encontraron diferencias entre los valores de Polimorfismo, G_{st} y N_m entre las poblaciones del norte y centro del país. En el caso específico de la población de El Tatio en que se observó diferenciación genética en algunos individuos se suma a la variación morfológica explicada principalmente por efectos ambientales que nos permiten avalar el hecho que esta población estaría dando cuenta de la mayor parte de incongruencia entre ambos niveles de análisis.

Pese a las desventajas que presenta el utilizar marcadores moleculares dominantes, como es el caso de los marcadores RAPD, diversos estudios de diferenciación genética han estado enfocados a comparar resultados obtenidos entre marcadores codominantes (como aloenzimas y microsatélites) y marcadores dominantes RAPD (Aagaard *et al.*, 1998; Le Corre *et al.*, 1997; De Wolf *et al.*, 1998), encontrándose que las estimaciones de G_{st} y N_m presentan congruencia en ambos casos. Esto adquiere especial importancia en estudios de taxa en los cuales no existen estudios genéticos-poblacionales previos y donde la información genética, como secuencias o partidores específicos, no se encuentran disponibles. En este contexto, la aplicación de correcciones que permiten minimizar el sesgo en los análisis genéticos propios de la naturaleza de los marcadores utilizados son de particular interés, tomando en cuenta la escasa información existente en *Bufo spinulosus*.

CONCLUSIONES

- Se observó una clara diferenciación, tanto a nivel morfológico como genético entre poblaciones del Norte y Centro de Chile producto del aislamiento por distancia entre estas poblaciones, reflejado en un bajo nivel de flujo genético, siendo potenciada por la presencia de barreras geográficas importantes (condiciones desérticas entre 25° y 30° latitud sur). Una alta correlación entre distancia geográfica y distancia genética reafirma este patrón.
- A nivel genético poblacional es posible observar niveles de flujo genético relativamente bajos entre las poblaciones. De acuerdo a los valores de F_{st} propuestos por Hartl y Clark (1997), las poblaciones estudiadas se encontrarían en un nivel de diferenciación genética alta, valores poco esperados entre poblaciones con distancias geográficas relativamente pequeñas (aproximadamente 60 km entre Chita y Tatio, y entre Chita y Vilama).
- Los valores de G_{st} observados en poblaciones de *B. spinulosus* en Chile estarían además dando cuenta de procesos históricos asociados a la reciente inserción de los regímenes climáticos, árido en el norte y mediterráneo en el centro del país, así como el origen relativamente reciente del grupo, con lo que puede explicarse la diferenciación genética particular de cada una de estas regiones.

- La falta de correspondencia entre morfología y genética se explica principalmente a la variación morfológica presente en la población del Tatio, la que además de presentar una diferenciación producto de la distancia geográfica, se ve afectada por factores ambientales, como la altura y la temperatura del agua.

BIBLIOGRAFIA

Aagaard, J. E., K. V. Krutovskii & S. H. Strauss. 1998. "RAPD and allozymes exhibit similar level of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir". *Heredity* 81: 69-78.

Armstrong, J., A. Gibbs., R. Peakall & G. Weiller. 1999. RAPDistance Package 1.04 Record and analyse of DNA fragment data.

Avise, J.C. 1994. "Molecular Markers, Natural History and Evolution". Chapman & Hall, Inc.

Blair, W. F. 1972. "Evolution of Genus *Bufo*". University of Texas Press. Austin.

Bertini, F. & J.M. Cei. 1960. "Observaciones electroforéticas en seroproteínas de poblaciones argentinas de *Bufo arenarum* Hensel". *Rev. Soc. Argent. Biol.* 36:355-362.

Bossart, J.L. & D.P. Prowell. 1998. "Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions". *Tree* 13 (5):202-206.

Castellano, S., C. Giacoma & T. Dujsebayaeva. 2000. "Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploid green toads". *Biological Journal of the Linnean Society* 70:341-360.

Cei, J. M. 1960. " Geographic Variation of *Bufo spinulosus* in Chile". *Herpetologica* 16(4): 143-250

Cei, J.M. 1961. "*Bufo arunco* (Molina) y las formas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegmann". *Inv. Zool. Chilenas* Vol. VII:59-81.

Cei, J.M. 1962 "Batracios de Chile". Ed. Universidad de Chile.

Cei, J. M. 1971. "Análisis sero-inmunológico de diferentes niveles de especiación en *Bufo* del grupo *spinulosus*". Acta Zoologica Lilloana, XXVIII: 91-105.

Cei, J. M. 1972. "*Bufo* of South America". *In* W.F. Blair. Ed. Evolution in the genus *Bufo*. Pp. 82-92. University of Texas Press. Austin.

Cei, J. M. 1980. "Amphibians of Argentina". Monitore Zoologico italiano. Monografía 2. Pubblicato dalla Universita degli studi di Firenze.

Cushwa, W.T. & J. F. Medrano. 1996. "Applications of the Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). Assay for genetics analisis of livestock species". Animal Biotechnology 7(1):11-31

De Wolf, H., T. Backeljau & R. Verhagen. 1998. "Congruence between allozyme and RAPD data in assessing macrogeographical genetic variation in the periwinkle *Littorina striata* (Mollusca, Gastropoda)". Heredity 81:486-492.

Díaz, N. F. & A. Veloso. 1979. "Sistemática y Evolución de los anfibios de Chile". Arch. Biol. Med. Exper. 12:59-70.

Green, D.M. 1983. "Allozyme variation through a clinal hybrid zone between the toads *Bufo americanus* and *B. hemiophrys* in southeastern Manitoba". Herpetologica 39(1):28-40.

Guttman, Sh. 1985. "Biochemical studies of anuran evolution". Copeia 2:292-309.

Hart, D. L. & A.G. Clark. 1997. "Principles of Population Genetics". 3th edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers.

Hedrick, P.W. 2000. "Genetics of populations". 2nd edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts.

Hillis, D.M., C. Moritz & B.K. Mable. 1996. "Molecular Systematics". 2nd edition Sinauer Associates, Inc. Publishers.

Jacksic, F. 1997. "Ecología de los vertebrados de Chile". Ed. Universidad Católica de Chile. Capítulo 3:41-46.

Kachigan, S. K. 1986. "Statistical Analysis: An interdisciplinary Introduction to Univariate & Multivariate Methods". Radius Press, New York.

Kalin-Arroyo, M.T., C. Villagrán, C. Marticorena & J.J. Armesto. 1982. "Flora y relaciones biogeográficas en los Andes del Norte de Chile (18°-19° S)". *En* "El hombre y los ecosistemas de montaña". MAB-6:71-92.

Kalin-Arroyo, M.T., F.A. Squeo, J.J. Armesto & C. Villagran. 1988. "Effects of aridity on plant diversity in the northern chilean andes: results of a natural experiment". *Annals of the Missouri Botanical Gardens* 75:55-78.

Karakousis, Y. & P. Kyriakopoulou-Sklavounou. 1995. "Genetic and Morphological differentiation among populations of the Green Toad *Bufo viridis* from Northern Greece". *Biochemical Systematics and Ecology* 23 (1):39-45.

Kirsten, J., C. Dawes & B. Cochrane. 1998. "Randomly amplified polymorphism detection (RAPD) reveals high genetic diversity in *Thalasia testudinum* banks ex König (Turtlegrass). *Aquat. Bot.* 61:269-287.

Le Corre, V., S. Dumolin-Lapegue & A. Kremer. 1997. "Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography". *Mol. Ecol.* 6:519-529.

Liedloff, A. 1999. MANTEL, Mantel nonparametric test calculator, version 2.0.

Lou, K., M. J. Weiss, W. L. Bruckner L.E. Morrill, L.E. Talbert & J. M. Martin. 1998. "RAPD variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton)". *J. Heredity* 89:329-335.

Lynch, M. & B.G. Milligan. 1994. "Analysis of population genetic structure with RAPD markers". *Mol. Ecology* 3:91-99.

Mantel. 1967. "The detection of disease clustering and a generalized regression approach". *Cancer Res.* 27:209-220.

Manly, B. F. J. 1994. "Multivariate Statistical Methods: a primer". 2nd edition. Chapman and Hall Publishers, London, UK.

Mathews, T.C. 1975. "Biochemical polymorphism in population of argentine toad, *Bufo arenarum*". *Copeia* 3:455-465.

Mayr, E. 1968. "Especies animales y evolución". Ediciones de la Universidad de Chile y Ediciones Ariel.

Mendelson, J.R. 1998. "Geographic variation in *Bufo valliceps* (Anura:Bufonidae), a widespread Toad in the United States and Middle America". *Natural History Museum, The University of Kansas* 8:1-20

Méndez, M. 2000. "El canto de liberación en el grupo *spinulosus*: consideraciones morfológicas e históricas". Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Mezey, A. 1979. "Variabilidad de caracteres y compatibilidad genética en especies del grupo *spinulosus*". Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias con mención en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Nei, M. 1972. "Genetic Distance between populations". Amer. Naturalist 106:283-292.

Nei, M. 1978. "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals". Genetics 89:583-590.

Nevo, E. 1978. "Genetic Variation in Natural Populations: Patterns and Theory". Theoretical Population Biology. Vol 13(1):121-177.

Núñez, H., M.A. Labra & J.Yañez. 1982. "Hábitos alimentarios de dos poblaciones andinas de *Bufo spinulosus* Wiegmann, 1835". Bol.Mus.Nac.Hist.Nat.Chile. 39:81-91.

Parker P.G., A.A. Snow, M.D. Shug, G. C. Booton & P.A.Fuerst. 1998. "What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker". Ecology 79(2):361-382.

Pavlièek, A., T. Pavlièek & J. Flegr. 1999. FREETREE, version 0.9.1.50. Folia Biologica (Praha) 45:97-99.

Penna, M. & A. Veloso. 1981. "Acoustical signals related to reproduction in *spinulosus* species group of *Bufo* (Amphibia, Bufonidae)". Can.J.Zool. Vol.59:54-60.

Richardson, B.J., P.R. Baverstock & M. Adams. 1986. "Allozyme Electroforesis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies". Academic Press. Inc.

Rohlf, F. J. 1998. NTSYSpc Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.0. Setaukel, New York. Exeter Software.

Statsoft, Inc. 1997. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK.

Simpson, B.B. 1979. "Quaternary Biogeography of the High Montane Regions of South America". *In* "The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution, and Dispersal. Museum of Natural History, The University of Kansas 7:157-188

Simpson, B.B. 1983. "An historical Phytogeography of the High Andean Flora". *Revista Chilena de Historia Natural* 56:109-122.

Soto, E., M. Méndez & A. Veloso. 1997. "Presencia de Heterocromatina Constitutiva (Bandeo C) y Cario-idigramas: Un estudio comparado preliminar en tres especies del grupo *spinulosus* (ANURA-BUFONIDAE)". Libro de resúmenes, XXX Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile.

Soto E. R., M. Méndez & A. Veloso. 1999. "Diferenciación genética entre poblaciones de *B. spinulosus* (ANURA-BUFONIDAE) en Chile". R185. Libro de Resúmenes. *Biological Research* Vol.32 Nro. 2-3, XLII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile.

Vellard, J. 1955. "El género *Bufo*, estudios sobre batracios andinos". *Mem. Mus. Hist. Nat.* 8:1-48.

Veloso, A., M. Sallaberry, J. Navarro, P. Iturra, J. Valencia, M. Penna & N. Díaz. 1982. "Contribución sistemática al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile". *En* "El hombre y los ecosistemas de montaña". MAB-6: 135-265.

Veloso A. & J. Navarro. 1988. "Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile". *Boll. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino.* 6:481-539.

Villagran, C., M.T. Kalin Arroyo & C. Marticorena. 1983. "Efectos de la desertización en la distribución de la flora andina de Chile". *Revista Chilena de Historia Natural* 56:137-157.

Wilkinson, L. 2000. SYSTAT: The system for statistics. Systat. Inc., Evanston, Illinois.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingley. 1990. "DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

Williams, G. C. 1992. "Natural Selection: Domains, Levels, and Challenges". Oxford University Press. Chap. 4:38-55.

Yablokov, A.V., A.S. Baranov & A.S. Rozanov. 1980. "Population structure, geographic variation, and Microphylogenesis of the Sand Lizard (*Lacerta agilis*)". *In*: Evolutionary Biology, Plenum Press, New York. Vol 12:91-127.

Yeh, F. C. 1999. POPGENE 1.31 University of Alberta, Canada.

Zeisset, I. & T.J.C. Beebee. 1998. RAPD identification of north European water frogs". *Amphibia-Reptilia* 19:163-170.

ANEXO II

Número efectivo de alelos por locus para cada una de las poblaciones y regiones estudiadas.

LOCUS	Farellones	Portillo	Lagunillas	Q.Jerez	Tatio	Vilama	C.Chita	CENTRO	NORTE	TOTAL
B-08.1	1.0000	1.0000	1.0000	1.7620	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.1704	1.9553
B-08.2	1.0000	1.0000	1.0000	1.1079	1.0000	1.3761	1.8688	1.0000	1.3311	1.9908
B-08.3	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
B-08.4	1.0000	1.7620	1.0000	1.0000	1.0000	1.9780	1.7620	1.2967	1.4469	1.3898
B-08.5	1.2328	1.0000	1.0000	1.2328	1.7071	1.3761	1.2328	1.8782	1.3851	1.8132
B-08.6	1.7620	1.7620	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.6344	1.0000	1.2167
B-08.7	1.7620	1.0000	1.0000	1.0000	1.1079	1.5366	1.0000	1.2967	1.1478	1.8712
B-08.8	1.0000	1.7620	1.0000	1.0000	1.9819	1.9780	1.0000	1.2967	1.5968	1.4832
B-08.9	1.1079	1.0000	1.0000	1.0000	1.9780	1.0000	1.0000	1.0437	1.2478	1.9686
B-08.10	1.9819	1.3761	1.3022	1.1079	1.3761	1.7071	1.9780	1.6727	1.6383	1.6513
B-08.11	1.9819	1.7620	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.3761	1.8546	1.4944	1.6400
B-08.12	1.0000	1.3761	1.0000	1.0000	1.9780	1.7620	1.0000	1.1453	1.9724	1.8823
B-08.13	1.0000	1.0000	1.0000	1.1079	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0260	1.8962
B-08.14	1.0000	1.9780	1.0000	1.7620	1.5366	1.9819	1.7071	1.4352	1.9420	1.9681
B-08.15	1.0000	1.0000	1.0000	1.9819	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.2509	1.1512
B-08.16	1.9819	1.9819	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.9849	1.0000	1.4805
B-08.17	1.7620	1.7071	1.0000	1.9780	1.0000	1.8688	1.0000	1.9576	1.5487	1.8525
B-10.1	1.0000	1.0000	1.0000	1.9780	1.9819	1.0000	1.0000	1.0000	1.5968	1.3561
B-10.2	1.0000	1.0000	1.0000	1.9780	1.9780	1.7620	1.0000	1.0000	1.7305	1.4425
B-10.3	1.0000	1.0000	1.0000	1.9819	1.9780	1.0000	1.0000	1.0000	1.5968	1.3561
B-10.4	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.9819	1.0000	1.0000	1.0000	1.3095	1.1856
B-10.5	1.3761	1.3761	1.0000	1.5366	1.3761	1.2328	1.1079	1.3075	1.3082	1.3079
B-10.6	1.0000	1.0000	1.0000	1.8688	1.5366	1.5366	1.9819	1.0000	1.7652	1.9577
B-10.7	1.9819	1.3761	1.0000	1.2328	1.8688	1.9819	1.8688	1.6166	1.7778	1.7199
B-10.8	1.0000	1.9780	1.0000	1.3761	1.9780	1.7620	1.7620	1.4352	1.9965	1.8721
B-10.9	1.0000	1.7071	1.0000	1.1079	1.7071	1.5366	1.9819	1.7113	1.6140	1.9551
B-10.10	1.0000	1.3761	1.0000	1.0000	1.0000	1.1079	1.2328	1.1453	1.6982	1.4869

