

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO



**“Variabilidad morfológica y genética de diploides, triploides y mosaicos
de *Liolaemus chiliensis* (Squamata: Liolaemidae)”**

Raúl Ignacio Araya Donoso

Directora del Seminario de Título: Prof. Madeleine Lamborot Chastía

Co-director: Dr. David Véliz Baeza

Junio 2017

Santiago, Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

RAÚL IGNACIO ARAYA DONOSO

“Variabilidad morfológica y genética de diploides, triploides y mosaicos de *Liolaemus chiliensis* (Squamata: Liolaemidae)”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Medio Ambiente.

Dra. Madeleine Lamborot Chastía

Directora Seminario de Título

Dr. David Veliz Baeza

Co-Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Claudio Veloso Iriarte

Presidente y evaluador

Dr. Elie Poulin Charmolue

Evaluador

Santiago de Chile, Junio de 2017

BIOGRAFÍA



Nací el 15 de enero de 1994 en Puente Alto. Desde pequeño siempre tuve decidido que quería trabajar con animales: Me pasaba horas armando parques safari con mis animales de juguete en el living de mi casa, o buscando chanchitos de tierra en el patio. En la medida que crecía, más me iba convenciendo de mi interés por la biología, en especial por los reptiles. En 2012 tuve la oportunidad de ingresar a estudiar Biología Ambiental, carrera que me apasiona y me hace feliz. El año 2015 comencé a trabajar con la profesora Madeleine Lambrot en el laboratorio de Citogenética Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y posteriormente con David Véliz en el laboratorio de Ecología y Genética en la misma facultad. En ambos laboratorios, he podido desarrollar el trabajo con reptiles, grupo de estudio que me apasiona. En el futuro espero seguir el área de la investigación, para continuar aprendiendo y trabajando en herpetología, ecología y biología evolutiva.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de mi carrera ha sido un proceso muy importante y constructivo para mí tanto en lo personal como en lo profesional. Quiero agradecerle a toda la gente que ha estado presente en este trayecto apoyándome, enseñándome y sobre todo aguantándome.

Le agradezco a mis tutores de tesis. A la profesora Madeleine Lamborot por todo su cariño y sabiduría, por haberme recibido como alumno en su laboratorio, por creer en mis ideas locas y mi pasión por los lagartijos, por las incontables tardes de conversaciones, contándome sus historias y experiencias (que ni se imagina cómo me han hecho aprender y crecer). A David Véliz, también por creer en mí y apoyar mis proyectos con los lagartijos, que no son tu organismo favorito de estudio, por recibirme e integrarme en tu laboratorio, por todos los consejos, conversaciones y risas, junto con tu inmensa experiencia y simpatía.

Le agradezco a Daniela Araya, María Loretto Donoso, Raúl Araya y María Suazo; mi familia. Por motivarme a estudiar algo que me apasiona y por apoyarme a lo largo de todo este proceso.

A Isadora Perelló, Esteban San Juan, Francisco Vargas, Ítalo Tamburrino y Pablo Jiménez por su amistad y cariño incondicional. A mis amigos con quienes hemos crecido y compartido tanto a lo largo de estos años, Cata Escanilla, Ángela Kloss, Cata García, Pascale Bustamante, Maca Martínez, Nacha España, Laura Pezoa, Amanda Osorio, Israel Pavez, Jaime Caro, Juan Hernández, Joaquín Araya, Paula Fôrmas y Caro Ugarte. Y a todos mis otros amigos que han sido parte de este proceso.

A mis compañeros de EcoGen, Tania Ramírez, Noemí Rojas, Matías Briones, Ingrid Alvial, Ernesto Díaz y Caren Vega. Por todos los gratos momentos y por todo lo que me han ayudado, enseñado y aconsejado en esta lucha con los lagartos.

Le agradezco a Sandra Brito, por tu inmenso cariño, por aguantarme en el laboratorio hace tanto tiempo, por cuidarme y ayudarme siempre que lo he necesitado.

A Carezza Botto, por tu cariño y apoyo incondicional, por creer en mí siempre, y por ofrecerme la oportunidad de trabajar contigo. Por los terrenos vinchuqueando a todo sol, por las buenas conversaciones, por los consejos y las risas. También a mis compañeros de Ecología Evolutiva por todos los momentos y los terrenos vinchuqueando.

A Marcela Vidal por todo el apoyo y enseñanzas que me has dado, y por compartir el amor a los reptiles. A Nicole Manzur por tu cariño y todas esas buenas tardes en el laboratorio. A Fernando Torres por creer en este proyecto y apoyar con consejos y recursos para realizar este estudio.

A Joaquín Contreras y a Luis Valenzuela, por hacerme crecer tanto, como persona y como científico. Por creer en mis ideas y proyectos, y motivarme a seguir jugándomela por los lagartijos.

Y finalmente, por supuesto, le agradezco a los lagartijos por existir. Por ser tan perfectos, bonitos e interesantes, lo que me ha dado la oportunidad estudiarlos, aprender y trabajar con ellos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	viii
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Objetivos	9
Materiales y Métodos	10
Resultados	19
Discusión.....	28
Conclusiones	34
Bibliografía	35
Anexos.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Loci de microsatélites utilizados en este estudio	16
Tabla 2: Número de individuos diploides (2n), mosaico (2n/3n) y triploides (3n) de <i>Liolaemus chiliensis</i> en cada grupo geográfico	19
Tabla 3: Valores de F_{ST} obtenidos con el gen del citocromo b (sobre la diagonal) y microsatélites (bajo la diagonal)	22
Tabla 4: Reasignación de individuos triploide y mosaico de <i>Liolaemus chiliensis</i> con los marcadores utilizados.....	26
Tabla 5: Probabilidad de reasignación de individuos triploides y mosaico a las distintas zonas geográficas con el modelo de discriminante morfológico	42
Tabla 6: Probabilidad de reasignación de individuos triploides y mosaico a las distintas zonas geográficas con el modelo del DAPC para los microsatélites	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Árbol de Máxima Parsimonia (1000 réplicas con bootstrap) con los principales clados de <i>Liolaemus chiliensis</i> . En rojo individuos que aparecen en un grupo no correspondiente con su zona de colecta (Lamborot y col., datos no publicados)	11
Figura 2: Mapa de Chile Central con la distribución geográfica de las zonas de muestreo de <i>Liolaemus chiliensis</i> . Grupo Norte en Rojo, Grupo Centro en Verde, Grupo Centro Sur en Amarillo y Grupo Sur en Azul. Las estrellas indican las poblaciones en que se han hallado individuos triploides y/o mosaico.....	12
Figura 3: Caracteres morfométricos utilizados en este estudio. Modificado de Pincheira-Donoso & Núñez (2005) y de Vidal y col. (2005).....	14
Figura 4: Hitos homólogos marcados en vista dorsal y lateral en <i>Liolaemus chiliensis</i> ..	15
Figura 5: Grillas de deformación de los dos primeros Componentes Principales (Relative Warps) del análisis de morfometría geométrica para la vista dorsal de la cabeza de <i>Liolaemus chiliensis</i> (a) y la vista lateral (b)	20
Figura 6: LDA realizado con las variables morfométricas en <i>Liolaemus chiliensis</i> diploides. Las elipses muestran el 90% de confianza	21
Figura 7: DAPC realizado con los microsatélites para <i>Liolaemus chiliensis</i> (Rojo = Norte, Verde = Centro, Amarillo = CentroSur, Azul = Sur).....	23
Figura 8: Red de haplotipos del gen mitocondrial cit-b para individuos diploides de <i>Liolaemus chiliensis</i>	24

Figura 9: Red de haplotipos del gen mitocondrial *cit-b* la cual incluye individuos diploides, mosaicos y triploides de *Liolaemus chiliensis*25

Figura 10: Proporción de triploides o mosaicos de *Liolaemus chiliensis* asignado a los posibles cruzamientos luego de la reasignación de individuos.....27

Figura 11: Modelo de los posibles eventos de migración y reproducción en *Liolaemus chiliensis*. Los números indican la cantidad de híbridos encontrados para cada posible evento32

RESUMEN

En reptiles, los fenómenos de poliploidía se relacionan generalmente con hibridación interespecífica, en ocasiones asociada a poblaciones unisexuales partenogénicas. En Chile, el lagarto *Liolaemus chiliensis* es una especie única en vertebrados por presentar numerosas poblaciones con un cariotipo diploide ($2n = 32$) plesiomórfico para *Liolaemus*, frente a otras poblaciones que poseen hembras diploides ($2n$), triploides ($3n$) o mosaico ($3n/2n$) y machos diploides o mosaico, capaces de reproducirse sexualmente. En este reptil no está claro el origen de la poliploidía; estudios previos sugieren que estos surgirían del cruzamiento entre individuos provenientes de poblaciones alopátricas dentro de la especie. Con el objetivo de identificar si los poliploides proceden de la cruce de individuos de poblaciones diferentes, se realizó un estudio de asignación individual en base a la variabilidad morfológica (análisis morfométricos) y genética (microsatélites y secuenciación del gen mitocondrial *cit-b*) de distintas poblaciones de esta especie a lo largo de su distribución geográfica. Con el análisis morfológico, se logró una reasignación del 98.5% de los individuos con la función discriminante. El análisis genético mostró F_{ST} significativos entre las poblaciones previamente delimitadas. Adicionalmente, se logró una reasignación del 93.9% de los individuos con los datos de los microsatélites. Los resultados mostraron que un 23.1% de los triploides y mosaico estudiados provienen de la reproducción de individuos de una misma población; al menos un 19.2% corresponderían al cruce entre poblaciones alopátricas y un 46.2% se categorizó como posible cruce entre poblaciones diferentes. Estos resultados sugieren que la presencia de organismos triploides o mosaico podría haber surgido tanto de la reproducción de organismos

provenientes desde diferentes poblaciones, como de la reproducción de individuos de una misma población.

ABSTRACT

In reptiles, polyploidy phenomena are generally related with interspecific hybridization, sometimes associated to parthenogenetic unisexual populations. The lizard *Liolaemus chiliensis* is a unique vertebrate species since it present populations with a diploid karyotype ($2n = 32$) pleosiomorphic for *Liolaemus*, against others populations that include diploids ($2n$), triploid ($3n$) or mosaic ($2n/3n$) females, and diploid or mosaic males able to reproduce sexually. In this reptile, the origin of polyploidy is not clear; previous studies suggest that these individuals came from the breed of lizards from allopatric populations of this species. With the aim of identify if polyploid individuals proceed from the reproduction of organisms from different populations, we made an individual assignment study based on morphological (morphometric analysis) and genetic (microsatellites and *cit-b* gene sequencing) variability of different populations along its geographical distribution. The morphological analysis had 98.5% of reassignment with the discriminant function. The genetic analysis showed significant F_{ST} between previously delimited populations and with microsatellite data, a reassignment of 93.9% was achieved. Results showed that 23.1% of triploids and mosaics proceed from de reproduction of individuals within the same population; at least 19.2% of individuals proceed from the breed between allopatric populations and 46.2% of individuals was categorized as possible breed between different populations. These results suggest that triploid and mosaic organisms could have arisen from both the reproduction from organisms from different populations and the reproduction within a same population.

INTRODUCCIÓN

La poliploidía, entendida como la existencia de más de dos set cromosómicos completos en una célula, es un fenómeno inusual en vertebrados, siendo reportado sólo en poblaciones de algunas especies de peces, anfibios, mamíferos y reptiles (Darevsky, 1966; Vanzolini, 1970; Dawley & Goodart, 1988; Porter, 1988; Gallardo y col., 1999; Stöck y col., 2002). Las variaciones cromosómicas son de especial relevancia en un contexto evolutivo (Otto, 2007). Diversos estudios explican cómo las mutaciones cromosómicas estructurales y/o numéricas pueden tener un papel de importancia en la especiación (Sites & Moritz, 1987; Olmo, 2005; Lamborot, 2008; Hall, 2010), ya sea reduciendo la fertilidad, creando barreras al flujo genético o influyendo en la diferenciación de individuos de una población (King, 1995).

En algunas especies que exhiben poliploidía se ha descrito mosaicismo, entendido como la existencia de células con diferente ploidía en el mismo organismo. El mosaicismo en vertebrados es un fenómeno excepcional, dado que generalmente implica anomalías, inviabilidad o infertilidad de los individuos con esta condición (Fechheimer y col., 1983). En reptiles, se han descrito poblaciones naturales que contienen individuos mosaicos y con reproducción sexual sólo en tres especies: la tortuga *Platemys platycephala* (Bickham y col., 1985) y en los lagartos *Darevskia unisexualis* (Kupriyanova, 1989) y *Liolaemus chiliensis* (Lamborot y col. 2006).

La ocurrencia de poliploidía, en general está asociada a eventos de hibridación e introgresión entre especies filogenéticamente relacionadas (Lowe & Wright, 1966; Sites y col., 1990). Existen variados modelos que intentan explicar el mecanismo en que la

hibridación podría gatillar la poliploidización, todos concordantes en que la existencia de dos genomas diferenciados desestabilizaría la meiosis pudiendo implicar la producción de gametos no reducidos (Choleva & Janko, 2013).

Una serie de marcadores morfológicos y genéticos se han utilizado como herramienta para abordar la hibridación asociada a la poliploidía entre especies o poblaciones. Los estudios morfológicos son frecuentes en la investigación de las características ecológicas y evolutivas en reptiles, y se han combinado exitosamente con análisis de morfometría geométrica (Vidal y col, 2006; Kaliontzopoulou y col., 2008; Fontanella y col., 2012; Ibáñez y col., 2015) como complemento a los análisis morfométricos tradicionales, dado que consideran como características las variaciones de forma y no solamente el tamaño (Rohlf & Slice, 1990). Los estudios morfológicos de hibridación han permitido encontrar que los híbridos tienden a tener fenotipos intermedios a los de las especies parentales (Doeringsfeld y col., 2004; Park y col., 2006; Manning y col., 2005).

Por otra parte, existen distintas herramientas genético-moleculares que permiten también detectar la hibridación. Por ejemplo, el análisis de secuencias de genes mitocondriales se ha utilizado para evaluar la existencia de introgresión entre dos linajes, dado que como este marcador es heredado como una sola unidad con una baja tasa de recombinación, se pueden observar haplotipos compartidos entre grupos distintos como consecuencia de los eventos de hibridación (Plötner et al., 2008; Irwin y col., 2009; Olave y col. 2011).

Otro marcador que posee múltiples aplicaciones en el ámbito de la genética de poblaciones, lo constituyen los microsatélites, secuencias extremadamente variables que permiten identificar alelos exclusivos pertenecientes a diferentes poblaciones o especies,

de manera que los híbridos presentarían composiciones alélicas similares a ambas poblaciones parentales (Jug y col., 2004; Verardi y col., 2006; Koopman y col., 2007; Randi, 2008).

En este estudio, se combinarán estas aproximaciones para abordar uno de los fenómenos de poliploidía existentes en *Liolaemus*. El género *Liolaemus* es un grupo altamente diversificado en el cono sur de Sudamérica (Donoso-Barros, 1996). Las especies de este género en Chile exhiben una variabilidad cariotípica considerable, con un grupo que comparte un cariotipo plesiomórfico ($2n = 32$) y otro grupo con especies que han incrementado su número de cromosomas, ya sea por fisiones céntricas Robertsonianas o por triploidía, lo que ha contribuido a su enorme diversificación en el país (Lamborot, 1993; Lamborot, 2008).

Se ha descrito la importancia de los ríos en esta diversificación, dado que constituyen barreras geográficas al flujo genético en reptiles a lo largo de Chile, contribuyendo a la diferenciación (Lamborot & Eaton, 1997; Salaberry-Pincheira y col., 2011). Además, se ha propuesto que en las dinámicas de las glaciaciones en el Pleistoceno, pudo existir flujo de individuos a través de estas barreras, como es el ejemplo descrito para *Liolaemus monticola* en que se ha detectado hibridación e introgresión entre razas cromosómicas en zonas próximas a los ríos (Torres-Pérez y col., 2007; Lamborot, 2008).

Liolaemus chiliensis (Lesson), es una especie de amplia distribución en Chile y parte de Argentina, abarcando desde el Sur de Coquimbo a Valdivia y desde el nivel del mar hasta los 2100 msnm. (Donoso-Barros, 1966). La mayoría de los individuos de la especie posee un número plesiomórfico de cromosomas diploide con $2n = 32$, con seis pares de macro-

cromosomas más diez pares de micro-cromosomas (Lamborot, 2008). Sin embargo, a lo largo de su rango de distribución se han reportado en algunas localidades, junto a individuos diplode, hembras triploides ($3n$) o mosaicos diploide-triploide ($2n/3n$) y machos mosaico ($2n/3n$) (Lamborot & Alvarez-Sarret 1989; Lamborot y col., 2006).

En los machos mosaico, los espermatogonios tanto diploides como triploides entran en meiosis, produciendo espermatocitos en metafase II reducidos (n) e irreducidos ($2n$), la mayoría de ellos euploides (Lamborot y col., 2006). Esto hace de *L. chiliensis* una especie única en vertebrados, ya que en los mosaicos de *Platemys platycephala*, las células que entran en meiosis son exclusivamente células $2n$ que forman gametos reducidos (n) (Bickham & Hanks, 2010) y en *Darevskia unisexualis*, un set cromosómico es eliminado antes de la meiosis en los espermatogonios triploides (Kupriyanova, 1989).

En esta especie, no está claro si la poliploidía tiene un origen aloploiploide o autoploiploide. Lamborot y col. (2006), describe que con análisis morfológicos preliminares, electroforesis de proteínas y secuenciación del gen citocromo b, no es evidente una hibridación de esta especie con alguno de los 30 taxa simpátricos descritos para *Liolaemus* en Chile. Una explicación alternativa, sería que una posible introgresión cromosómica y/o genética entre individuos alopátricos de *L. chiliensis* dio origen a los triploides y mosaicos, posibilitada por la migración de individuos al cruzar los ríos durante los ciclos glaciales-interglaciales en el Pleistoceno, como se ha propuesto para *Liolaemus monticola* (Lamborot & Eaton, 1997; Lamborot y col., 2003).

Con el objetivo de evaluar si la poliploidía en esta especie corresponde al cruce entre poblaciones alopátricas, el principal objetivo de este estudio fue caracterizar la morfología

y la composición genética de *L. chiliensis* a lo largo de su distribución en Chile, examinando en detalle a los individuos triploides y mosaicos. Esperando encontrar, en el caso de que existiera reproducción entre poblaciones diferentes, que estos individuos posean morfologías y composiciones genéticas similares a las de poblaciones distintas a las de su origen. Esto permitiría caracterizar uno de los mecanismos que han generado variabilidad en los reptiles de Chile y comprender los fenómenos evolutivos asociados a la poliploidía.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar la variabilidad genética y morfológica de *Liolaemus chiliensis* a lo largo de su distribución geográfica y determinar si los individuos poliploides provienen del cruzamiento de individuos de una misma población o son producto de la reproducción de individuos de poblaciones diferentes.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar la variación morfológica de individuos diploide de *L. chiliensis* provenientes de poblaciones diferentes, mediante morfometría tradicional y morfometría geométrica.
- Caracterizar la variabilidad genética y estructuración poblacional de individuos diploides provenientes de poblaciones diferentes, con la secuenciación del gen *cit-b* y microsatélites.
- Asignar morfológica y genéticamente individuos triploide y mosaico a alguno de los grupos determinados previamente con el análisis de diploides, para determinar si provienen del cruce entre poblaciones distintas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y especímenes utilizados

Especímenes de *Liolaemus chiliensis* (n = 115) fueron muestreados a lo largo de su rango de distribución en Chile entre los años 1989 y 2007. Estudios previos en esta especie sugieren la existencia de cuatro principales clados separados por grandes ríos como barreras geográficas (Figura 1) (Lamborot y col., datos no publicados). Se utilizaron estos grupos para clasificar a los lagartos utilizados: Un primer grupo se definió al norte del Río Maipo (Grupo Norte), el segundo se situó entre los Ríos Maipo y Rapel (Grupo Centro), un tercer grupo se definió entre el Río Rapel y el Río Biobío (Grupo Centro-Sur), y el último se situó al sur del Río Biobío (Grupo Sur) (Figura 2). Los especímenes fueron sacrificados mediante inyección de uretano en el ojo pineal y se encuentran depositados en la colección del Laboratorio de Citogenética Evolutiva, Departamento de Ciencias Ecológicas, Universidad de Chile (Apéndice 1). De cada individuo se extrajo una muestra de médula ósea, hígado, bazo y, en los machos, testículo para la obtención de cromosomas. Muestras de corazón, hígado y músculo se preservaron en alcohol 95% para la extracción de ADN.

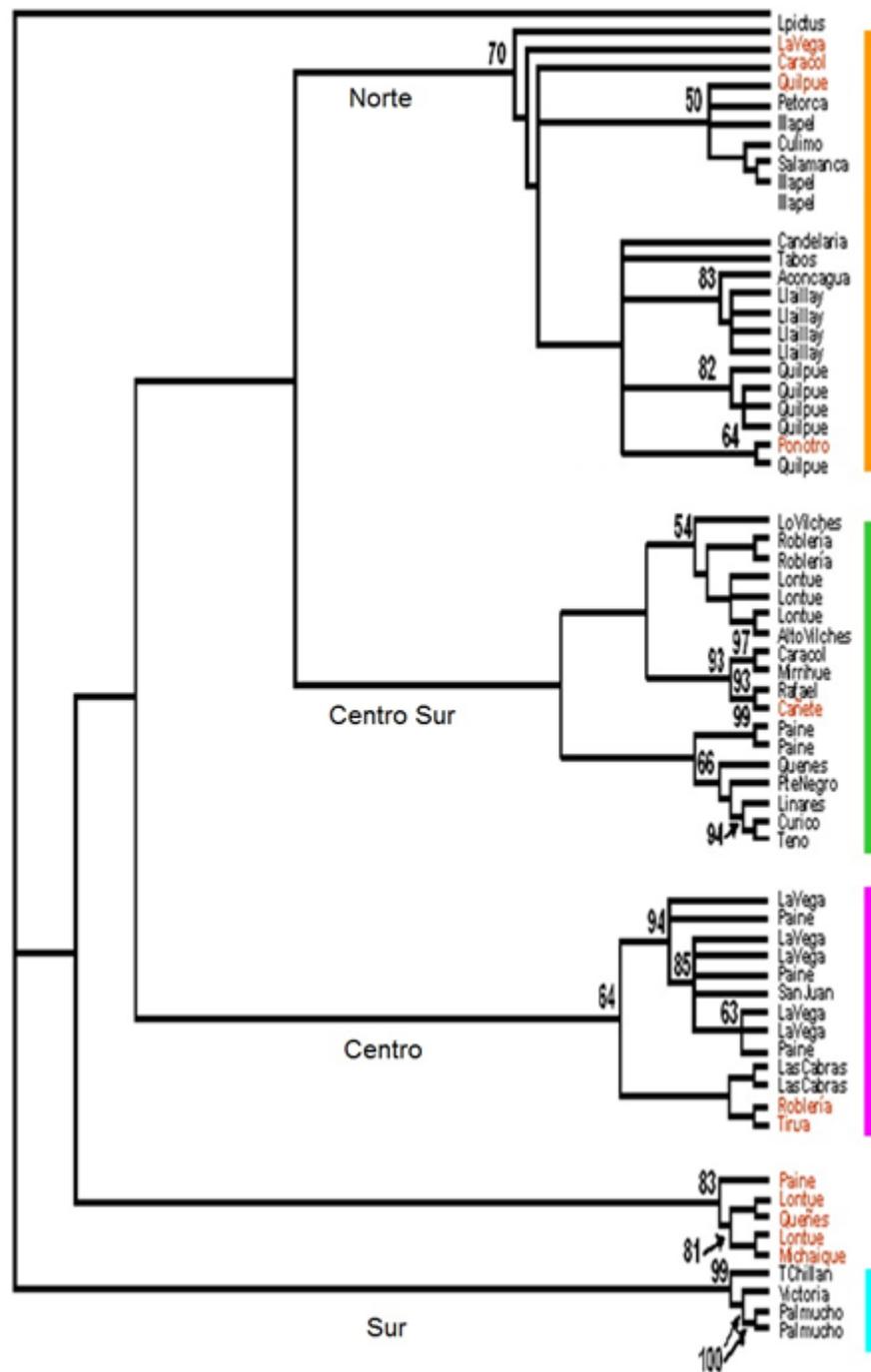


Figura 1: Árbol de Máxima Parsimonia (1000 réplicas con bootstrap) con los principales clados de *Liolaemus chiliensis*. En rojo individuos que aparecen en un grupo no correspondiente con su zona de colecta (Lamborot y col., datos no publicados).

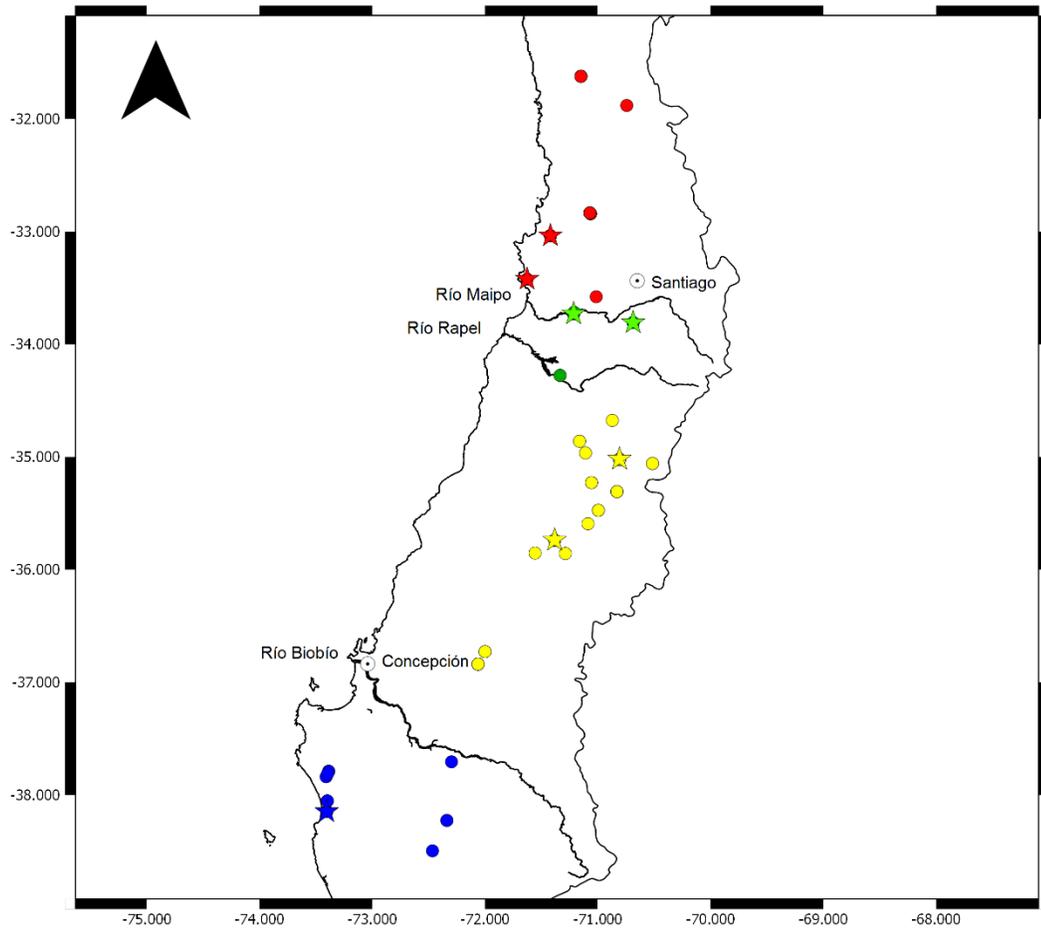


Figura 2: Mapa de Chile Central con la distribución geográfica de las zonas de muestreo de *Liolaemus chiliensis*. Grupo Norte en Rojo, Grupo Centro en Verde, Grupo Centro Sur en Amarillo y Grupo Sur en Azul. Las estrellas indican las poblaciones en que se han hallado individuos triploides y/o mosaico.

Descripción Cariotípica

Las preparaciones cromosómicas fueron obtenidas de machos y hembras de una mezcla de tejidos somáticos (médula ósea, bazo e hígado) y testículos separadamente utilizando

la técnica de secado al aire pretratado con colchicina-hipotónica y se tiñeron con Giemsa (Lamborot y col., 2006). Se examinaron placas metafásicas mitóticas y meióticas para diagnosticar el grado de ploidía encontrado en los tejidos somáticos y testiculares. Cada organismo se categorizó según su ploidía y locación geográfica. Se consideró mosaico aquella lagartija en que hubiera al menos una célula somática o meiótica que presentara la condición triploide junto con otras células diploides.

Morfometría

Cada macho y hembra de *L. chiliensis* se midió con un pie de metro (± 0.01 mm) para los siguientes caracteres morfológicos: Longitud Hocico-Cloaca (SVL), Distancia Axila-Ingle (AGD), Largo de la Extremidad Anterior (AL), Largo de la Extremidad Posterior (FL), Ancho Máximo de la Cabeza (MHW), Largo de la Cabeza (HL), Distancia Escama Interparietal-Hocico (ISD), Tamaño de la Escama Interparietal (IS), Distancia Interocular (ID), Largo del Ojo (EL), Distancia Nariz-Ojo (END) (Figura 3) (Vidal y col., 2005). Cada una de las variables morfométricas se estandarizó dividiendo por la Longitud Hocico-Cloaca.

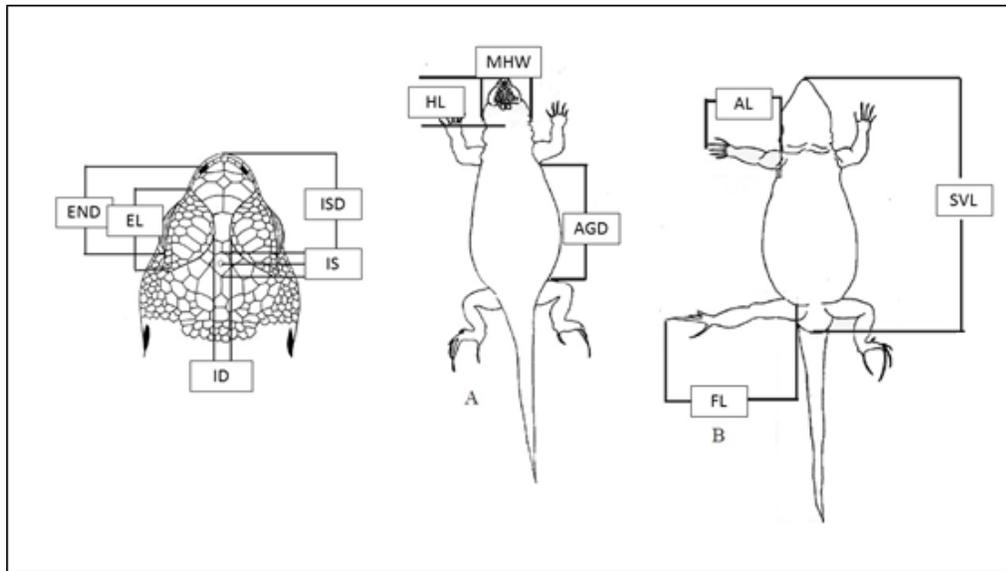


Figura 3: Caracteres morfométricos utilizados en este estudio. Modificado de Pincheira-Donoso & Núñez (2005) y de Vidal y col. (2005).

Para los análisis de morfometría geométrica, se tomaron fotos de la vista dorsal y lateral derecha de la cabeza de cada individuo con una cámara Fujifilm FinePix S4600. Con el programa TpsDig (Rohlf, 2003a) se marcaron 9 hitos homólogos en la intersección de las escamas craneales para la vista dorsal y 9 hitos para la vista lateral por separado, acorde con Vidal y col. (2006) (Figura 4). Posteriormente, las coordenadas de los hitos fueron alineadas y superpuestas para remover las diferencias debidas a tamaño, rotación y traslación dejando sólo las que se deban a la forma, mediante el método de mínimos cuadrados del análisis generalizado de Procrusto (Rohlf & Slice, 1990) con el programa TpsRelw (Rohlf, 2003b). Con este mismo programa se realizó un análisis de Componentes Principales (Relative Warps Analysis) para visualizar las variaciones de forma. Además, se produjeron grillas de deformación mediante la regresión de las variables de forma con las variables canónicas, también en TpsRelw. Finalmente, se extrajeron los “scores” de la

matriz de Relative Warps (RW) y estos valores se utilizaron como variables de forma en los análisis estadísticos posteriores (Adams & Rohlf, 2000).

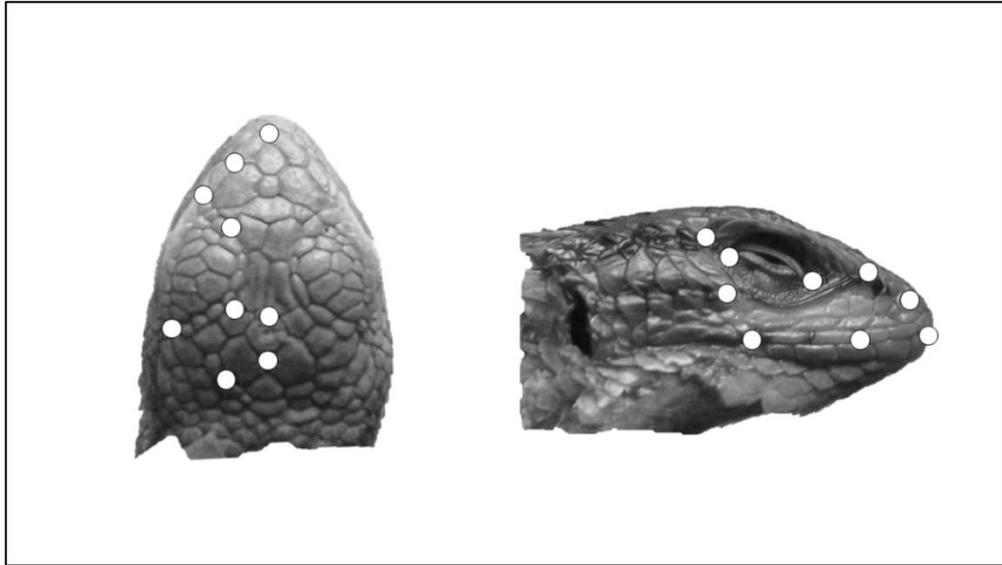


Figura 4: Hitos homólogos marcados en vista dorsal y lateral en *Liolaemus chiliensis*.

Extracción de DNA genómico

Se extrajo DNA de tejidos (1 mg. apróx.) de lagarto preservados en alcohol 95% (corazón, hígado o músculo) utilizando el protocolo de extracción salina descrito por Aljanabi & Martínez (1997), su concentración fue cuantificada con un espectrofotómetro marca Nanodrop.

Amplificación citocromo b

Se amplificó el gen mitocondrial cit-b, mediante una reacción de 25 μ l de solución final: Taq DNA polimerasa a 5 U/ μ l, 2.5 μ l buffer 10X y 1 μ l de $MgCl_2$, 0.5 μ l de DNTps (10mM), 1 μ l (25uM) de los primers: GLUD: 5'-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG y CB3: 5'-GGCAAATAGGAARTATCATTC (Palumbi, 1996) y 2 μ l de DNA genómico

(50ng/ μ L). El PCR constó de 5 min. A 95°C, seguido por 35 ciclos de 90 seg. de denaturación a 94°C, 25 seg. de alineamiento a 52°C y 90 seg. de extensión a 72°C, y culminando con una extensión de 8 min. a 72°C. Los productos PCR fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc. Las secuencias del ADN mitocondrial obtenidas, fueron editadas manualmente y alineadas con el programa ProSeq 2.0 (Filatov, 2009). Con el programa PopArt 1.7 (<http://popart.otago.ac.nz>) se construyó una red de haplotipos con el método “Median Joining Network” para visualizar la relación genealógica de los haplotipos.

Amplificación de Microsatélites

Se probaron 21 microsatélites desarrollados para *Liolaemus* (Murphy y col., 2009; Hanna y col., 2012). La amplificación de los microsatélites se realizó mediante PCR siguiendo los protocolos de Murphy y col. (2009) y Hannah y col. (2012) respectivamente.

De los microsatélites probados, los 7 que pudieron amplificar (Tabla 1) fueron genotificados en el servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Posteriormente, la matriz de alelos se obtuvo con la ayuda del programa Genemarker (SoftGenetics Inc).

Tabla 1: Loci de microsatélites utilizados en este estudio

Locus	Nº de Alelos	Referencia
Lio101	12	Murphy y col. (2009)
Lio106	14	
Lio107	11	
Lio108	11	
Lio134	7	
DI7938	3	Hannah y col. (2012)
TET2216	9	

Caracterización Morfológica

Los individuos estudiados, agrupados por poblaciones geográficas, se compararon morfológicamente mediante un Análisis de Discriminante Lineal, considerando en conjunto las variables morfométricas tradicionales y las de morfometría geométrica dorsal y lateral. Para este análisis se utilizaron solamente individuos diploide y se realizó en el software R 3.1.1 (R Core Team, 2016).

Estructuración Poblacional

Se realizaron dos tipos de análisis para determinar el grado de diferenciación poblacional de los diploides de *Liolaemus chiliensis* agrupados geográficamente. Primero, se estimó F_{ST} entre pares de poblaciones geográficas utilizando el software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Este análisis se realizó para citocromo-b y microsatélites separadamente y la significancia se obtuvo utilizando un test de permutaciones (10.000 réplicas) implementado en el mismo programa. Segundo, se realizó un Análisis de Discriminantes para Componentes Principales (DAPC) (Jombart y col., 2010) para los loci de microsatélites obtenidos de los lagartos diploides. Este análisis se realizó en R 3.1.1 con el paquete “adegenet” (Jombart, 2008).

Reasignación de individuos triploides y mosaico

Se utilizó el modelo del Discriminante Lineal de los datos morfológicos para obtener la probabilidad de reasignación de los individuos triploides y mosaico a alguno de los grupos geográficos definidos.

Posteriormente, se sometió a estos lagartos al modelo realizado con el DAPC. Como en los organismos poliploides no es posible determinar con exactitud la proporción alélica en individuos heterocigotos, los microsatélites fueron analizados como marcadores dominantes considerando presencia o ausencia del alelo (Dufresne y col., 2014), para poder aplicar la función discriminante a los individuos poliploides.

Con el fin de determinar si los triploides y mosaicos de esta especie correspondían a cruces entre las poblaciones estudiadas, se evaluó su probabilidad de asignación a cada localidad geográfica con ambos modelos, eligiendo la localidad a la que se asignaran con una probabilidad del 60% o mayor. Se consideraron provenientes de reproducción entre poblaciones alopátricas aquellos individuos en los que al menos dos marcadores coincidieron al indicar la pertenencia del individuo a una zona geográfica distinta de la de origen. Si sólo un marcador asoció al individuo a una zona geográfica que no correspondía a su origen, se consideró como posible cruce entre poblaciones distintas. Si todos los marcadores coinciden con la zona de origen del individuo, este se consideró como proveniente de un cruce entre individuos de la misma población.

RESULTADOS

Descripción Cariotípica

La tabla 2 resume la cantidad de individuos asignados a cada categoría según el diagnóstico cromosómico.

Tabla 2: Número de individuos diploides (2n), mosaico (2n/3n) y triploides (3n) de *Liolaemus chiliensis* en cada grupo geográfico.

	2n	2n/3n	3n
Norte	28	7	-
Centro	9	11	4
Centro-Sur	23	3	-
Sur	27	1	-

Caracterización Morfológica

Con el análisis de la morfometría geométrica de la vista dorsal se obtuvieron 14 Relative Warps. El primer componente principal (19.6%), mostró un ensanchamiento lateral de la cabeza hacia valores positivos, mientras que el segundo (13.7%) correspondió con un alargamiento antero-posterior de la cabeza (Figura 5a). En la vista lateral de la cabeza de los lagartos se obtuvieron 14 Relative Warps. El RW1 (28.0%) se correspondió con una compresión antero-posterior de la cabeza del lagarto, mientras que el RW2 (19.3%) mostró una disminución en el tamaño proporcional de la cavidad ocular (Figura 5b).

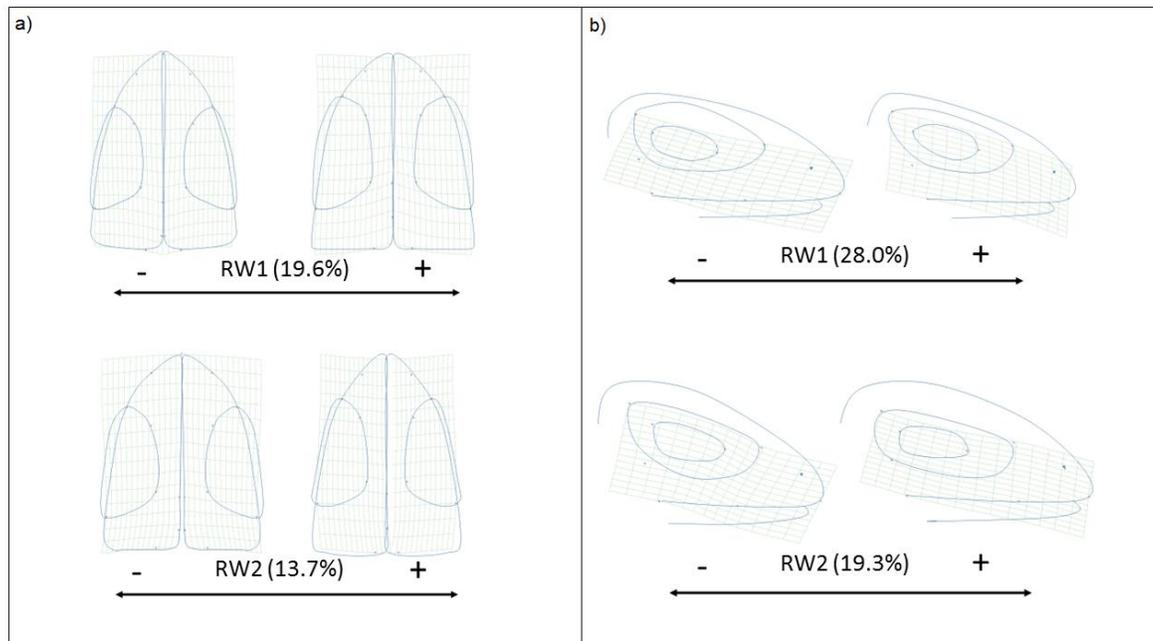


Figura 5: Grillas de deformación de los dos primeros Componentes Principales (Relative Warps) del análisis de morfometría geométrica para la vista dorsal de la cabeza de *Liolaemus chiliensis* (a) y la vista lateral (b).

Para caracterizar cada una de las poblaciones estudiadas, se realizó un análisis de discriminante lineal con todas las mediciones morfométricas en conjunto (Figura 6). El LD1 permitió explicar el 49.82% de la varianza y se asoció con AL, ID, EL y las variables de la morfometría geométrica de la vista dorsal de la cabeza del lagarto; permitió segregar los individuos de la zona Sur respecto de los demás. El LD2 explicó un 34.34% y se asoció principalmente a las variables ISD, EL, END y AGD; permitió diferenciar los individuos de los grupos Norte, Centro y CentroSur. Con la función discriminante generada se logró un 98.5% de éxitos en la reasignación de individuos.

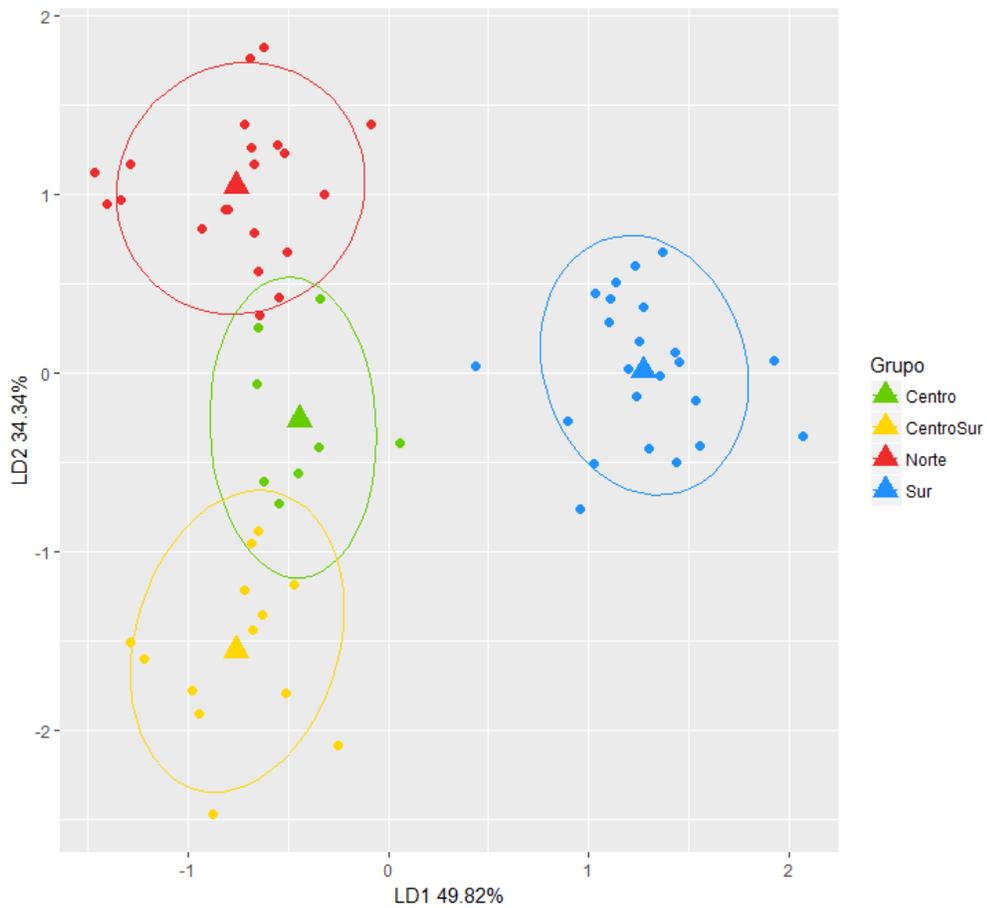


Figura 6: LDA realizado con las variables morfométricas en *Liolaemus chiliensis* diploides. Las elipses muestran el 90% de confianza.

Estructuración Poblacional

Se estimó la diferenciación entre grupos geográficos de *L. chiliensis*, mediante el cálculo de F_{ST} a partir de los datos de citocromo-b y de microsatélites. La Tabla 3 muestra sobre la diagonal los valores obtenidos con el marcador mitocondrial, donde se pudieron detectar diferencias significativas entre los cuatro grupos estudiados. Con los microsatélites (Tabla 3, bajo la diagonal) fue posible detectar diferencias sólo entre el grupo Norte y los demás, y entre las poblaciones Centro y Sur.

Tabla 3: Valores de F_{ST} obtenidos con el gen del citocromo b (sobre la diagonal) y microsatélites (bajo la diagonal).

	Norte	Centro	CentroSur	Sur
Norte	-	0.23*	0.43*	0.13*
Centro	0.095*	-	0.30*	0.10*
CentroSur	0.12*	0.019	-	0.25*
Sur	0.17*	0.044*	0.015	-

*: Diferencias significativas.

Con los datos de los microsatélites se realizó un DAPC para visualizar la diferenciación genética entre poblaciones (Figura 7). El primer discriminante tuvo una importancia del 63.81% y permitió separar al grupo Norte de los demás. El segundo, explicó un 30.60% y segregó los grupos Centro Sur y Sur. Finalmente, el tercer discriminante lineal acumuló el 5.59% de varianza y permitió separar los individuos de la zona Centro del resto. Con la función discriminante se obtuvo un 93.9% de éxitos en la reasignación de individuos.

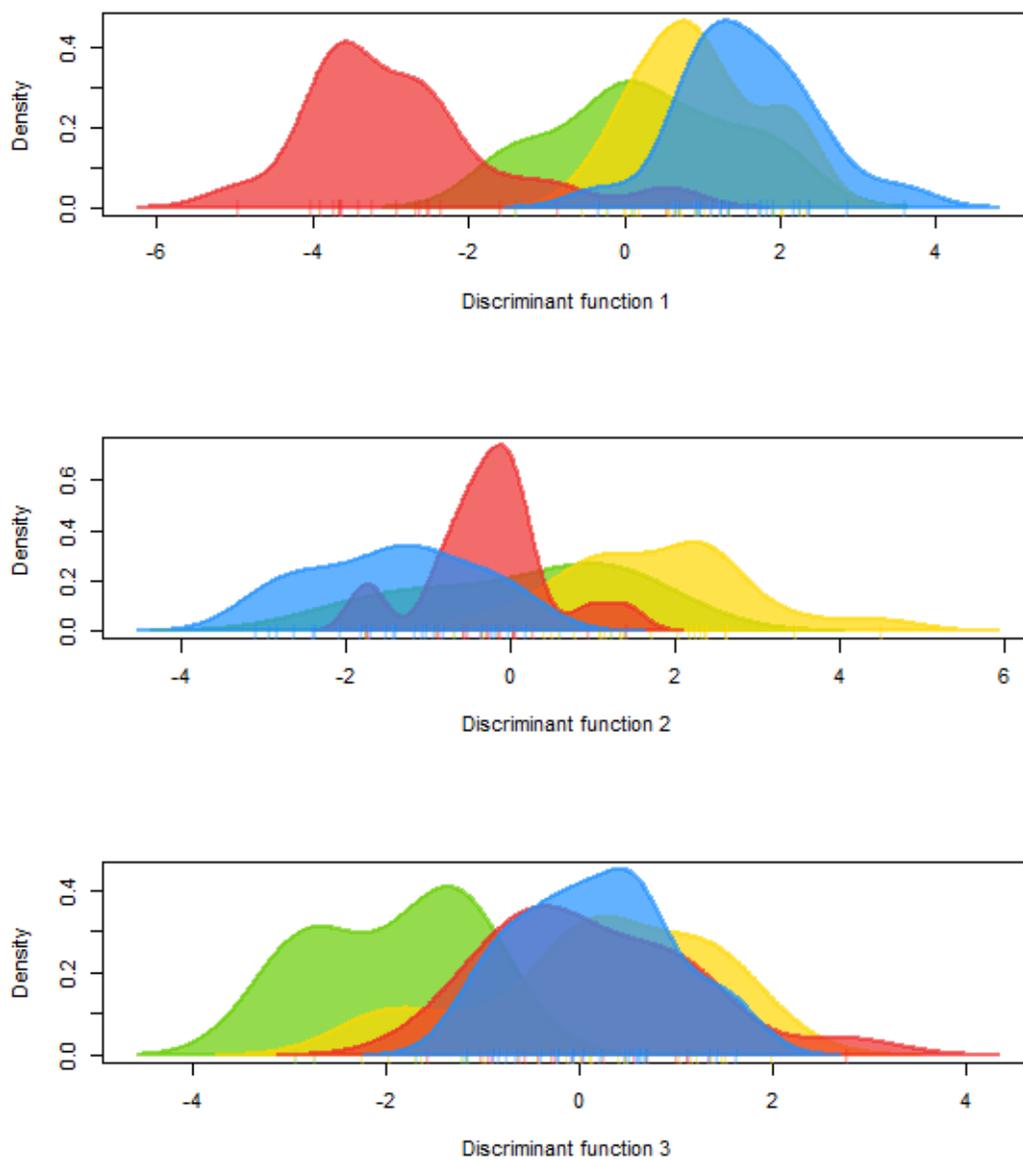


Figura 7: DAPC realizado con los microsatélites para *Liolaemus chiliensis* (Rojo = Norte, Verde = Centro, Amarillo = CentroSur, Azul = Sur).

La Figura 8 muestra la red de haplotipos del gen *cit-b* de los individuos diploides de *L. chiliensis*. Se puede observar una segregación de los grupos Norte, Centro y CentroSur.

Los haplotipos correspondientes a la zona Sur, aparecen en distintas zonas de la red sin una agrupación clara. Se puede observar que existen algunos individuos que poseen haplotipos correspondientes a otras localidades geográficas.

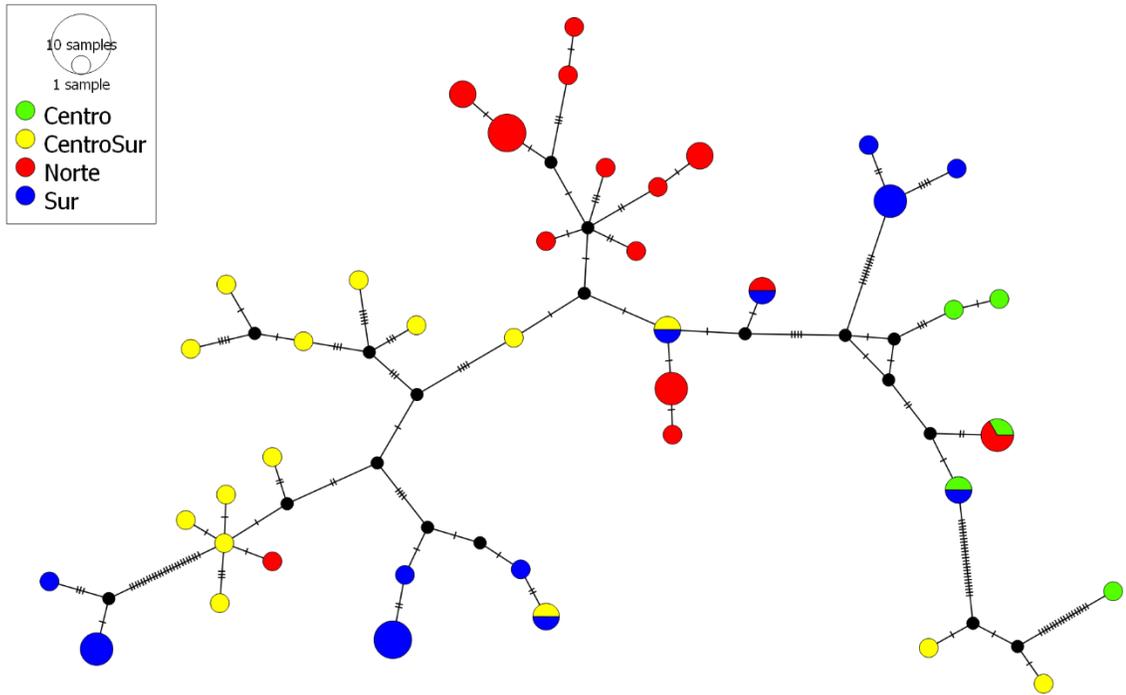


Figura 8: Red de haplotipos del gen mitocondrial cit-b para individuos diploides de *Liolaemus chiliensis*.

Reasignación de individuos triploides o mosaico

Las funciones discriminantes de morfología y microsatélites se utilizaron para asignar a alguna categoría a los individuos triploide y mosaico. Las tablas 5 y 6 en el Anexo muestran las probabilidades con que cada individuo se asignó a cada zona geográfica. La Figura 9 muestra la red de haplotipos con el gen cit-b incluyendo en el análisis individuos diploides, triploides y mosaico. En general, se observó que los individuos poliploide

poseen haplotipos correspondientes a su zona geográfica de origen; sin embargo, también es posible observar algunas excepciones en los grupos Centro Sur y Sur.

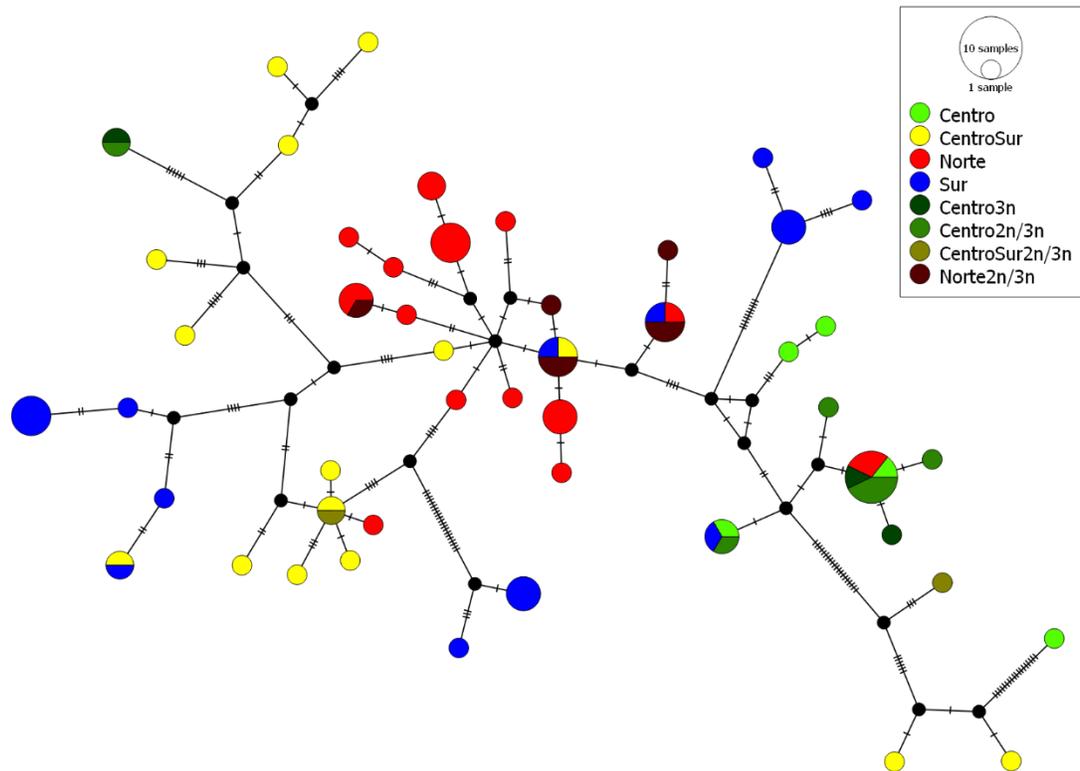


Figura 9: Red de haplotipos del gen mitocondrial cit-b la cual incluye individuos diploides, mosaicos y triploides de *Liolaemus chiliensis*.

La tabla 4 resume los resultados obtenidos al reasignar los individuos triploides y mosaicos con las funciones discriminates de morfología y de microsatélites, además de su posición en la red de haplotipos realizada con el gen citocromo-b. Del total de individuos triploides y mosaico analizado, el 19.2% pudo identificarse como proveniente de un cruce entre poblaciones distintas, un 46.2% se categorizó como posiblemente proveniente de un cruce entre poblaciones diferentes. El 23.1% de los individuos se clasificó como

proveniente de reproducción entre individuos de la misma población y un 11.5% no pudo ser clasificado (Figura 10).

Tabla 4: Reasignación de individuos triploide y mosaico de *Liolaemus chiliensis* con los marcadores utilizados.

Individuo	Ploidía	Origen	Morfología	Microsatélites	Citocromo-b
L2829	Mosaico	Norte	CentroSur	CentroSur	Norte
L3015	Mosaico	Norte	Sur	Sur	Norte
L3017	Mosaico	Norte	Norte	Norte	Norte
L3036	Mosaico	Norte	Sur	CentroSur	Norte
L3113	Mosaico	Norte	Norte	CentroSur	Norte
L3116	Mosaico	Norte	Norte	Centro	Norte
L3120	Mosaico	Norte	Norte	Sur	Norte
L1160	Mosaico	Centro	Norte	-	Centro
L1274	Mosaico	Centro	Centro	-	-
L1276	Mosaico	Centro	Centro	Sur	Centro
L1339	Mosaico	Centro	Centro	-	Centro
L1737	Mosaico	Centro	CentroSur	-	Centro
L3034	Mosaico	Centro	Centro	Centro	-
L3038	Triploide	Centro	Norte	CentroSur	-
L3039	Triploide	Centro	Centro	CentroSur	Centro
L3054	Mosaico	Centro	Norte	Centro	Centro
L3055	Mosaico	Centro	CentroSur	Centro	Centro
L3056	Mosaico	Centro	Sur	Centro	Centro
L3073	Triploide	Centro	CentroSur	CentroSur	CentroSur
L3127	Mosaico	Centro	CentroSur	CentroSur	CentroSur
L3278	Mosaico	Centro	Norte	Centro	-
L3286	Mosaico	Centro	Sur	CentroSur	-
L1281	Mosaico	CentroSur	-	CentroSur	-
L3117	Mosaico	CentroSur	Sur	CentroSur	CentroSur
L3121	Mosaico	CentroSur	CentroSur	CentroSur	Centro
L3231	Mosaico	Sur	Sur	-	-

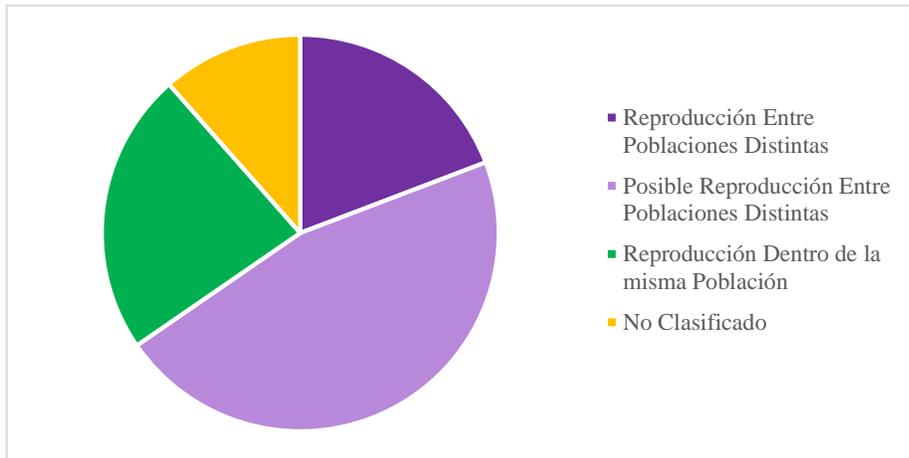


Figura 10: Proporción de triploides o mosaicos de *Liolaemus chiliensis* asignado a los posibles cruzamientos luego de la reasignación de individuos.

DISCUSIÓN

La ocurrencia de poliploidía, por lo general está asociada a hibridación e introgresión entre especies filogenéticamente relacionadas (Lowe & Wright, 1966; Sites y col., 1990). Los resultados obtenidos permiten diferenciar los grupos poblacionales de *Liolaemus chiliensis*, y al examinar en detalle los individuos triploides y mosaico, al menos 19.2% puede identificarse como cría entre poblaciones diferentes, apoyando la idea de introgresión entre poblaciones alopátricas asociada a la existencia de poliploidía en esta especie.

Diferenciación y caracterización de poblaciones de Liolaemus chiliensis

Los resultados muestran que los grupos geográficos de esta especie a lo largo de su distribución latitudinal en Chile se encuentran diferenciados genéticamente. Esto es concordante con lo que se ha descrito para otras especies de *Liolaemus* en el país, en que se observa un patrón de diferenciación genética a lo largo del territorio y con poblaciones delimitadas por los ríos como barreras geográficas (Torres-Pérez y col., 2007; Victoriano y col., 2008; Salaberry-Pincheria y col., 2011).

Asociada a esta diferenciación genética encontrada, fue posible una caracterización morfológica de las distintas poblaciones estudiadas. En otros *Liolaemus* de Chile, también se ha descrito la existencia de patrones de variación clinal de caracteres morfológicos a lo largo del gradiente latitudinal del país (Lambrot & Eaton, 1992; Vidal y col., 2005). La conformación morfológica de cada grupo geográfico de *L. chiliensis*, está directamente relacionada con sus características ecológicas. Estudios en reptiles han asociado los

patrones morfológicos encontrados con aspectos dietarios, comportamientos territoriales y conductas reproductivas (Olsson y col., 2002; Vidal y col., 2005; Vidal y col., 2006; Kaliontzopolou y col., 2008). En el caso de esta especie, es necesario estudiar en detalle las configuraciones morfológicas de cada uno de los grupos geográficos abordados en este estudio para comprender las consecuencias ecológicas asociadas a estas diferencias.

Cruzamiento entre individuos de diferentes poblaciones como explicación a la presencia de triploidía y mosaicismo en Liolaemus chiliensis

Los resultados obtenidos al utilizar los marcadores morfológicos y genéticos, mitocondriales y nucleares, permiten sugerir que al menos en el 19.2% de los individuos estudiados con la condición triploide o mosaico, la poliploidía se encuentra asociada a la reproducción entre grupos de poblaciones alopátricas separadas por los ríos. Otros estudios han detectado la presencia de introgresión a partir de una aproximación genética y morfológica, y han corroborado que la combinación de distintas metodologías permite una mejor determinación de la condición híbrida en los grupos estudiados y un mayor entendimiento de los procesos que podrían haber originado estos fenómenos (Lu y col., 2001; Dupuis & Sperling, 2015).

Del porcentaje restante, en el 46.2% de los triploides o mosaico sólo un marcador sugería características de una población alopátrica, de manera que no se contó con el sustento suficiente para considerarlos como crías recientes entre poblaciones diferentes. Esto puede deberse a la carga cromosómica de cada individuo, es decir: un triploide podría tener dos juegos cromosómicos de un parental A y sólo uno de un parental B, por lo tanto presentaría más características de A que de B, tal como describe Christiansen (2005). Otra explicación

sería que el marcador mitocondrial, al corresponder solamente a herencia materna, no da cuenta de todos los posibles sucesos de reproducción, ya que podría haber existido un flujo de individuos mayormente asociado a los machos de la especie (Lamer y col. 2010). El 23,1% que no pudo diagnosticarse como híbrido, podría deberse a que con los marcadores utilizados no se pudo detectar esta condición. O bien, la poliploidía en *Liolaemus chiliensis* podría corresponder también a autoploidía como se ha propuesto en *Leiolepis* (Phimphan y col. 2013).

Es importante resaltar que la reproducción entre grupos distintos asociada a la poliploidía en esta especie constituye un fenómeno de importancia evolutiva, dado que las mutaciones cromosómicas pueden afectar directamente la adecuación biológica, generar barreras al flujo génico, influir en la diferenciación y reducir la fertilidad de los individuos con alguna alteración (Sites & Moritz, 1987; King, 1995; Olmo, 2005; Otto, 2007). En este sentido, surge una serie de preguntas acerca de cuáles son las consecuencias evolutivas que podría tener esta condición.

Algunos estudios sustentan que los organismos poliploides poseen tasas de recombinación más altas, diferencias metabólicas, cambios en la expresión génica y desviaciones en la meiosis al compararse con los individuos diploides (Choleva & Janko, 2013; Madlung, 2013; Stenberg & Saura, 2013; Werheim y col., 2013). Lamborot y col. (2006) reportó la existencia de quiasmas en las células meióticas de los machos mosaico, evidenciando la existencia de recombinación en *L. chiliensis*. Considerando la naturaleza mestiza de los triploides y mosaico junto con esta recombinación se tiene una elevada variación genética, como lo reportó He y col. (2012) en los individuos híbridos poliploides de *Carassius*

auratus con *Erythroculter ilishaeformis*, donde había mayor variabilidad genética asociada con la recombinación entre los cromosomas de los diferentes parentales. A futuro deben estudiarse las consecuencias evolutivas que podría tener la poliploidía en *Liolaemus chiliensis*, tomando en cuenta esta posible variabilidad adicional.

Otro alcance importante, es que en reptiles la hibridación y la poliploidía ha sido asociada con partenogénesis (Fujita & Moritz, 2010; Neaves & Baumann, 2010; Choleva y col., 2012). En el género, se describió la especie *Liolaemus parthenos* que presenta este modo reproductivo asociado a la hibridación (Abdala y col., 2016). Lamborot & Álvarez-Sarret (1989) reportaron que las hembras triploides de *Liolaemus chiliensis* son reproductivas, pero sin poder evaluar si se reproducían sexual o asexualmente. Es necesario evaluar si las hembras triploides de esta especie tienen la posibilidad de reproducirse a partir de partenogénesis.

Eventos de hibridación e introgresión en lagartos ya han sido descritos en Chile, como es el caso de *Liolaemus monticola* (Torres-Pérez y col., 2007), donde ha existido flujo genético asociado a migración al cruzar los ríos durante los ciclos glaciales-interglaciales en el Pleistoceno (Lamborot & Eaton, 1997; Lamborot y col., 2003). Con los resultados de este trabajo, es posible sugerir que el intercambio de material genético en *L. chiliensis* ha ocurrido a lo largo de todo su rango de distribución; ya que en las distintas poblaciones se han encontrado posibles crías de poblaciones alejadas geográficamente.

La figura 11 resume los posibles eventos de migración e introgresión que han ocurrido en la especie a lo largo de Chile. Las flechas indican de dónde provendrían (según las características genéticas y morfológicas) los triploides y mosaico encontrados. Se puede

observar la ocurrencia de traspasos desde una rivera a otra de los ríos a lo largo de toda la distribución, con una mayor tendencia a la migración desde el sur hacia el norte en los individuos diagnosticados en este estudio. Esto es coincidente con el modelo descrito para *L. monticola* en que se describe una posible colonización de sur a norte (Vásquez y col., 2007). Es necesario estudiar con más detalle los procesos biogeográficos que den explicación a los patrones genéticos y morfológicos encontrados.

Es importante considerar que *Liolaemus chiliensis* es un lagarto grande y de hábitos arborícolas y trepadores (Donoso-Barros, 1966; Mella, 2005). Por lo tanto, es posible que haya ocurrido migración de individuos a través del dosel vegetacional en circunstancias de disminución del cauce de los ríos, o a través de la utilización refugios glaciales. Esto habría permitido a esta especie el desplazamiento a lo largo del territorio nacional, posibilitando la reproducción entre grupos distanciados.

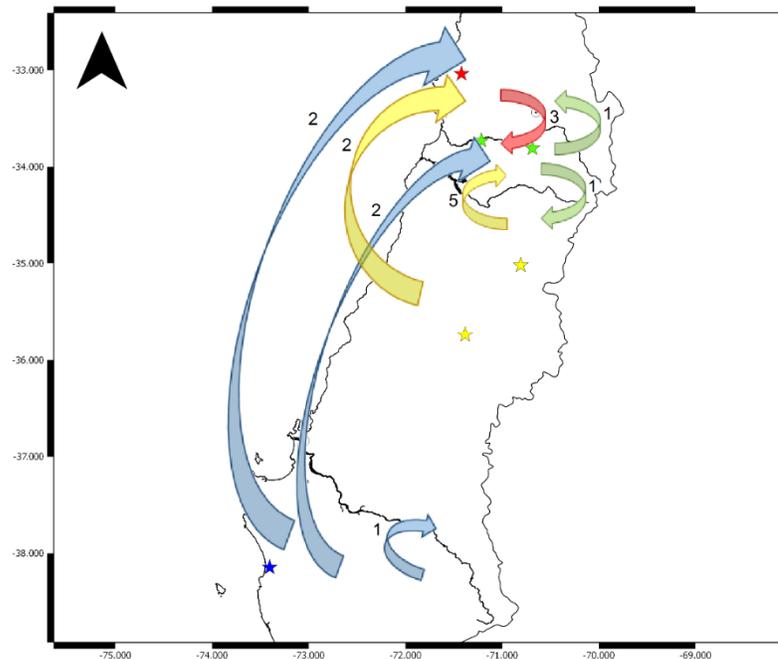


Figura 11: Modelo de los posibles eventos de migración y reproducción en *Liolaemus chiliensis*.

Los números indican la cantidad de híbridos encontrados para cada posible evento.

Este estudio constituye un avance preliminar en el estudio de las mutaciones cromosómicas. Aún queda pendiente entender los mecanismos genéticos y meióticos en que se origina la poliploidía, estudiar en detalle los eventos biogeográficos que permitieron la migración y reproducción en esta especie, y abordar las consecuencias genéticas y ecológicas que pueden tener estos fenómenos, tales como cambios en la expresión génica, la dieta o el comportamiento. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten caracterizar uno de los mecanismos en los que se ha podido generar la existencia de fenómenos únicos en vertebrados como lo son la triploidía y el mosaicismo, asociándolos a la existencia de intercambio de material genético entre grupos diferenciados de esta singular especie.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten dar soporte a la idea de intercambio de material genético entre poblaciones alopátricas de *Liolaemus chiliensis*, asociada a los eventos de triploidía y mosaicismo. Este estudio constituye una primera aproximación a entender los mecanismos que han permitido la existencia de la enorme diversidad presente en los lagartos *Liolaemus*, vislumbrando la importancia evolutiva que tienen los eventos de introgresión y las alteraciones cromosómicas en los distintos linajes de reptiles. A futuro, es necesario abordar las distintas preguntas que surgen con este estudio acerca de las consecuencias ecológicas y genéticas que tendrían estos fenómenos, además de los mecanismos biogeográficos y genéticos en que han podido originarse.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdala, C.S., Baldo, D., Juárez, R.A., Espinoza, R.E. 2016. The First Parthenogenetic Pleurodont Iguanian: A New All-female *Liolaemus* (Squamata: Liolaemidae) from Western Argentina. *Copeia*, **4**: 487-497.
- Adams, D.C., Rohlf, F.J. 2000. Ecological character displacement in *Plethodon*: biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 4106-4111.
- Aljanabi, S.M., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4692-4693.
- Bickham, J.W., Tucker, P.K., Legler, J.M. 1985. Diploid-triploid mosaicism: An unusual phenomenon in side-necked turtles (*Platemys platycephala*). *Science*, **227**: 1591-1593.
- Bickham, J.W., Hanks, B.G. 2010. Diploid-triploid mosaicism and tissue ploidy diversity within *Platemys platycephala* from Suriname. *Cytogenetic and Genome Research*, **127**: 280-286.
- Choleva, L., Janko, K., De Gelas, K., Bohlen, J., Šlechtová, V., Rábová, M., Ráb, P. 2012. Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. *Evolution*, **66**: 2191-2203.
- Choleva, L., Janko, K. 2013. Rise and persistence of animal polyploidy: evolutionary constraints and potential. *Cytogenetic and Genome Research*, **140**: 151-170.
- Christiansen, D.G. 2005. A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. *Molecular Ecology Notes*, **5**: 190-193.
- Darevsky, I.S. 1966. Natural parthenogenesis in a polymorphic group of Caucasian rock lizards related to *Lacerta saxicola* Eversmann. *Journal of Herpetology*, **5**: 115-152.
- Dawley, R.M., Goddard, K.A. 1988. Diploid-triploid mosaics among unisexual hybrids of the minnows *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus*. *Evolution*, **42**: 649-659.
- Doeringsfeld, M.R., Schlosser, I.J., Elder, J.F., Evenson, D.P. 2004. Phenotypic consequences of genetic variation in a gynogenetic complex of *Phoxinus eos-neogaeus* clonal fish (Pisces: Cyprinidae) inhabiting a heterogeneous environment. *Evolution*, **58**: 1261-1273.
- Donoso-Barros, R. 1966. Reptiles de Chile. pp 170-173. Ediciones Universidad de Chile.
- Dupuis, J.R., Sperling, F.A. 2015. Repeated reticulate evolution in North American *Papilio machaon* group swallowtail butterflies. *PloS One*, **10**: e0141882.

- Dufresne, F., Stift, M., Vergilino, R., Mable, B.K. 2014. Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Molecular Ecology*, **23**: 40-69.
- Excoffier, L. and H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 564-567.
- Fechheimer, N.S., Isakova, G.K., Belyaev, D.K. 1983. Mechanisms involved in the spontaneous occurrence of diploid-triploid chimerism in the mink (*Mustela vison*) and chicken (*Gallus domesticus*). *Cytogenetic and Genome Research*, **35**: 238-243.
- Filatov D.A. 2009. Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, **25**: 3189-3190
- Fontanella, F.M., Feltrin, N., Avila, L.J., Sites, J.W., Morando, M. 2012. Early stages of divergence: phylogeography, climate modeling, and morphological differentiation in the South American lizard *Liolaemus petrophilus* (Squamata: Liolaemidae). *Ecology and Evolution*, **2**: 792-808.
- Fujita, M.K., Moritz, C. 2010. Origin and evolution of parthenogenetic genomes in lizards: current state and future directions. *Cytogenet. and Genome Research*, **127**: 261-272
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Kohler, N. 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*, **401**: 341.
- Hall, W.P. 2010. Chromosome variation, genomics, speciation and evolution in *Sceloporus* lizards. *Cytogenet. and Genome Research*, **127**: 143-165.
- Hannah, N., Brown, D., Avila, L.J., Sites Jr, J.W., Morando, M., Fontanella, F.M. 2012. Characterization of 10 polymorphic microsatellite loci in the South American lizard *Liolaemus fitzingerii* with cross-amplification in *L. chehuachekenk*. *Conservation Genetics Resources*, **4**: 105-107.
- He, W., Qin, Q., Liu, S., Li, T., Wang, J., Xiao, J., Xie, L., Liu, Y. 2012. Organization and variation analysis of 5S rDNA in different ploidy-level hybrids of red crucian carp × topmouth culter. *PLoS ONE*, **7**: e38976.
- Ibáñez, S., Vidal, M.A., Ortiz, J.C., Torres-Pérez, F. 2015. Geometric morphometric analysis of the head of *Microlophus atacamensis* (Tropiduridae) in a latitudinal gradient. *Zoological Studies*, **54**: 1-8.
- Irwin, D.E., Rubtsov, A.S., Panov, E.N. 2009. Mitochondrial introgression and replacement between yellowhammers (*Emberiza citrinella*) and pine buntings (*Emberiza leucocephalos*) (Aves: Passeriformes). *Biological Journal of the Linnean Society*, **98**: 422-438.
- Jombart, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, **24**: 1403-1405.

- Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*, **11**: 94.
- Jug, T., Berrebi, P., Snoj, A. 2005. Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation*, **123**: 381-388.
- Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Llorente, G.A. 2008. Head shape allometry and proximate causes of head sexual dimorphism in *Podarcis lizards*: joining linear and geometric morphometrics. *Biological Journal of the Linnean Society*, **93**: 111-124.
- King, M. 1995. *Species evolution: the role of chromosome change*. New York. Cambridge University Press.
- Koopman, W.J., Li, Y., Coart, E., Van de Weg, W., Vosman, B., Roldán-Ruiz, I., Smulders, M.J. 2007. Linked vs. unlinked markers: multilocus microsatellite haplotype-sharing as a tool to estimate gene flow and introgression. *Molecular Ecology*, **16**: 243-256.
- Kupriyanova, L.A. 1989. Cytogenetic evidence for genome interaction in hybrid lacertid lizards. In: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*, p. 236-240. Dawley R.M. and Bogart J.P. Ed., New York State Museum.
- Lamborot, M., Alvarez-Sarret, E. 1989. Karyotypic characterization of some *Liolaemus* lizards in Chile (Iguanidae). *Genome*, **32**: 393-403.
- Lamborot, M., Eaton, L.C. 1992. Concordance of morphological variation and chromosomal races in *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) separated by riverine barriers in the Andes. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **30**: 189-200.
- Lamborot, M. 1993. Chromosomal evolution and speciation in some Chilean lizards. *Evolutionary Biology*, **7**: 133-151.
- Lamborot, M., Eaton, L. 1997. The Maipo River as a biogeographical barrier to *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) in the mountain ranges of central Chile. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **35**: 105-111.
- Lamborot, M., Eaton, L.C., Carrasco, B.A. 2003. The Aconcagua River as another barrier to *Liolaemus monticola* (Sauria: Iguanidae) chromosomal races of central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **76**: 23-34.
- Lamborot, M., Manzur, M. E., & Alvarez-Sarret, E. 2006. Triploidy and mosaicism in *Liolaemus chiliensis* (Sauria: Tropiduridae). *Genome*, **49**: 445-453.
- Lamborot, M. 2008. Evolución cromosómica en Reptiles. In: *Herpetología de Chile*, p. 161-193. Vidal, M.A., Labra, A. Ed. Science Veriag.

- Lamer, J.T., Dolan, C.R., Petersen, J.L., Chick, J.H., Epifanio, J.M. 2010. Introgressive hybridization between bighead carp and silver carp in the Mississippi and Illinois Rivers. *North American Journal of Fisheries Management*, **30**: 1452-1461.
- Lowe, C.H., Wright, J.W. (1966): Evolution of parthenogenetic species of *Cnemidophorus* (whiptail lizards) in western North America. *Journal of the Arizona Academy of Science*, **4**: 81-87.
- Lu, G., Basley, D. J., & Bernatchez, L. (2001). Contrasting patterns of mitochondrial DNA and microsatellite introgressive hybridization between lineages of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*); relevance for speciation. *Molecular Ecology*, **10**: 965-985.
- Madlung, A. (2013): Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity*, **110**: 99-104.
- Manning, G.J., Cole, C.J., Dessauer, H.C., Walker, J.M. 2005. Hybridization between parthenogenetic lizards (*Aspidoscelis neomexicana*) and gonochoristic lizards (*Aspidoscelis sexlineata viridis*) in New Mexico: ecological, morphological, cytological, and molecular context. *American Museum Novitates*, **3492**: 1-56.
- Mella, J. 2005. Guía de campo de reptiles de Chile: Zona Central. pp 44-45. Ediciones del Centro de Ecología Aplicada. Santiago.
- Murphy, A.R., Gardner, M.G., Fox, S.F. 2009. Isolation of microsatellites via enrichment and a sequence tagged method in a South American lizard with suspected parental care, *Liolaemus leopardinus*. *Conservation Genetics Resources*, **1**: 13-16.
- Neaves, W.B., Baumann, P. 2011. Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends in Genetics*, **27**: 81-88.
- Olave, M., Martinez, L.E., Avila, L.J., Sites, J.W., Morando, M. 2011. Evidence of hybridization in the Argentinean lizards *Liolaemus gracilis* and *Liolaemus bibronii* (Iguania: Liolaemini): an integrative approach based on genes and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **61**: 381-391.
- Olmo, E. 2005. Rate of chromosome changes and speciation in reptiles. *Genetica*, **125**: 185-203.
- Olsson, M., Shine, R., Wapstra, E., Ujvari, B., Madsen, T. 2002. Sexual dimorphism in lizard body shape: the roles of sexual selection and fecundity selection. *Evolution*, **56**: 1538-1542.
- Otto, S.P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, **131**: 452-462.
- Palumbi, S.R. 1996. PCR and molecular systematics. *Molecular systematics*, **2**: 205-247.
- Park, I.S., Nam, Y.K., Kim, D.S. 2006. Growth performance, morphometric traits and gonad development of induced reciprocal diploid and triploid hybrids between the mud loach (*Misgurnus mizolepis* Günther) and cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus* Cantor). *Aquaculture Research*, **37**: 1246-1253.

- Pincheira-Donoso, D., Núñez, H. 2005. Las especies Chilenas del género *Liolaemus* Wiegmann, 1834 (Iguania: Tropicuridae: Liolaeminae): taxonomía, sistemática y evolución. Museo Nacional de Historia Natural Chile, Publicación Ocasional 59/2005. 489pp.
- Phimphan, S., Tanomtong, A., Patawang, I., Kaewsri, S., Jantararat, S., Sanoamuang, L. O. 2013. Cytogenetic study of Northeastern butterfly lizard, *Leiolepis reevesii* rubritaeniata (Squamata, Agamidae) in northeast Thailand. *Cytologia*, **78**: 133-140.
- Plötner, J., Uzzell, T., Beerli, P., Spolsky, C., Ohst, T., Litvinchuk, S.N., Guex, G.D., Reyer, H.U., Hotz, H. 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**: 668-681.
- Porter, C.A. 1988. Triploidy in the lizard, *Sceloporus grammicus*. *Journal of Herpetology*, **22**: 112-115.
- R Core Team. 2015. The R project for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Website: <http://www.R-project.org>.
- Randi, E. 2008. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology*, **17**: 285-293.
- Rohlf, F.J., Slice, D. 1990: Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, **39**: 40-59.
- Rohlf F.J. (2003a): TPSDIG. Version 1.22. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. Website: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf F.J. (2003b): TPSRELW. Version 1.21. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. Website: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Sallaberry-Pincheira, N., Garin, C.F., González-Acuña, D., Sallaberry, M.A., Vianna, J.A. 2011. Genetic divergence of Chilean long-tailed snake (*Philodryas chamissonis*) across latitudes: conservation threats for different lineages. *Diversity & Distribution*, **17**: 152-162.
- Sites, J.W., Moritz, C. 1987. Chromosomal evolution and speciation revisited. *Syst. Biol.*, **36**: 153-174.
- Sites, J.W., Peccinnini-Seale, D.M., Moritz, C., Wright, J.W., Brown, W.M. 1990. The evolutionary history of parthenogenetic *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria, Teiidae). I. Evidence for a hybrid origin. *Evolution*, **44**: 906-921.
- Stenberg, P., Saura, A. 2013. Meiosis and its deviations in polyploid animals. *Cytogenetic and Genome Research*, **140**: 185-203.
- Stöck, M., Lamatsch, D.K., Steinlein, C., Epplen, J.T., Grosse, W.R., Hock, R., Klapperstück, T., Lampert, K., Scheer, U., Schmid, M., Scharl, M. 2002. A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nature Genetics*, **30**: 325-328.

- Torres-Pérez, F., Lamborot, M., Boric-Bargetto, D., Hernández, C.E., Ortiz, J.C., Palma, R. E. 2007. Phylogeography of a mountain lizard species: an ancient fragmentation process mediated by riverine barriers in the *Liolaemus monticola* complex (Sauria: Liolaemidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **45**: 72-81.
- Vanzolini, P.E. 1970. Unisexual *Cnemidophorus lemniscatus* in the Amazonas valley: a preliminary note (Sauria: Teiidae). *Papéis Avulsos de Zoologia São Paulo*, **23**: 63-49.
- Vásquez, M., Torres-Pérez, F., Lamborot, M. 2007. Genetic variation within and between four chromosomal races of *Liolaemus monticola* in Chile. *The Herpetological Journal*, **17**: 149-160.
- Verardi, A., Lucchini, V., Randi, E. 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology*, **15**: 2845-2855.
- Victoriano, P.F., Ortiz, J.C., Benavides, E., Adams, B.J. 2008. Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from the central-southern Andean range. *Molecular Ecology*, **17**: 2397-2416.
- Vidal, M.A., Ortiz, J.C., Ramírez, C.C., Lamborot, M. 2005. Intraspecific variation in morphology and sexual dimorphism in *Liolaemus tenuis* (Tropiduridae). *Amphibia-Reptilia*, **26**: 343-351.
- Vidal, M. A., Veloso, A., & Méndez, M. A. 2006. Insular morphological divergence in the lizard *Liolaemus pictus* (Liolaemidae). *Amphibia-Reptilia*, **27**: 103-111.
- Wertheim, B., Beukeboom, L.W., Van de Zande, L. 2013. Polyploidy in animals: effects of gene expression on sex determination, evolution and ecology. *Cytogenetic and Genome Research*, **140**: 256-269.

ANEXOS

Apéndice 1: Lista de individuos utilizados en este estudio, depositados en la colección del Laboratorio de Citogenética Evolutiva, Departamento de Ciencias Ecológicas, Universidad de Chile.

- Norte: 2n: L1213, L1489, L1494, L1819, L2251, L2299, L2425, L2431, L2978, L3004, L3005, L3006, L3007, L3008, L3035, L3074, L3075, L3076, L3077, L3078, L3079, L3080, L3085, L3094, L3096, L3112, L3123, L3124. 2n/3n: L1274, L2829, L3015, L3017, L3036, L3113, L3116, L3120.
- Centro: 2n: L1158, L1343, L1738, L2737, L2738, L3126, L3272, L3273, L3336. 2n/3n: L1276, L1339, L1737, L3034, L3054, L3055, L3056, L3127, L3278, L3286. 3n: L1160, L3038, L3039, L3073.
- CentroSur: 2n: L1280, L1298, L1307, L1340, L2115, L2117, L2118, L2119, L2393, L2394, L2395, L2708, L2827, L2828, L2989, L3118, L3119, L3122, L3293, L3294, L3301, L3307, L3308. 2n/3n: L1281, L3117, L3121.
- Sur: 2n: L3131, L3133, L3134, L3135, L3136, L3137, L3167, L3168, L3172, L3180, L3213, L3222, L3224, L3225, L3227, L3230, L3240, L3241, L3242, L3243, L3244, L3250, L3251, L3252, L3253, L3254, 26263, 26266. 2n/3n: L3231.

Tabla 5: Probabilidad de reasignación de individuos triploides y mosaico a las distintas zonas geográficas con el modelo de discriminante morfológico.

Individuo	Origen	Prob. Norte	Prob. Centro	Prob. CentroSur	Prob. Sur
L2829	Norte	0	0	1	0
L3015	Norte	0	1	0	0
L3017	Norte	0	0	1	0
L3036	Norte	0.481	0.5	0.019	0
L3113	Norte	0.002	0	0	0.998
L3116	Norte	0	0	1	0
L3120	Norte	0	0	0.086	0.914
L1160	Centro	1	0	0	0
L1274	Centro	0.494	0.468	0.038	0
L1276	Centro	0	0	1	0
L1339	Centro	0.002	0	0.998	0
L1737	Centro	0	0	1	0
L3034	Centro	0.317	0.683	0	0
L3038	Centro	0	1	0	0
L3039	Centro	0	1	0	0
L3054	Centro	0	1	0	0
L3055	Centro	0	0	0	1
L3056	Centro	0.919	0	0.081	0
L3073	Centro	1	0	0	0
L3127	Centro	0.983	0	0.017	0
L3278	Centro	0	0	0.91	0.09
L3286	Centro	0	0	0.126	0.874
L1281	CentroSur	-	-	-	-
L3117	CentroSur	0	0	1	0
L3121	CentroSur	0	0	0	1
L3231	Sur	0	0	0.143	0.856

Tabla 6: Probabilidad de reasignación de individuos triploides y mosaico a las distintas zonas geográficas con el modelo del DAPC para los microsátélites.

Individuo	Origen	Probabilidad Norte	Probabilidad Centro	Probabilidad CentroSur	Probabilidad Sur
L2829	Norte	-	-	-	-
L3015	Norte	-	-	-	-
L3017	Norte	0.865	0.111	0	0.023
L3036	Norte	0.441	0.411	0.003	0.145
L3113	Norte	0.998	0	0	0.001
L3116	Norte	0.679	0.006	0.023	0.291
L3120	Norte	0.068	0.858	0.011	0.063
L1160	Centro	0.256	0	0.002	0.741
L1274	Centro	0.311	0.687	0	0
L1276	Centro	0.006	0.992	0	0.002
L1339	Centro	0.745	0.008	0.211	0.036
L1737	Centro	0.229	0	0	0.77
L3034	Centro	0.005	0.967	0	0.028
L3038	Centro	0.065	0.716	0	0.218
L3039	Centro	0.002	0.61	0	0.388
L3054	Centro	0.019	0.617	0.359	0
L3055	Centro	0.213	0	0.007	0.779
L3056	Centro	-	-	-	-
L3073	Centro	-	-	-	-
L3127	Centro	0.907	0.043	0	0.05
L3278	Centro	0.091	0.884	0.013	0.013
L3286	Centro	0.263	0.723	0	0.015
L1281	CentroSur	0.026	0.953	0	0.02
L3117	CentroSur	0.001	0.091	0.908	0
L3121	CentroSur	0.217	0.775	0.005	0.003
L3231	Sur	-	-	-	-